Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
124° (2006), Vol. XXX, P. II, pp. 301-313

ADRIANA VALLESI * – PIERANGELO LUPORINI *

Eredità citoplasmatica e fenomeni epigenetici nei ciliati

Summary - Ciliates are among the first organisms that raised research interest in phenomena of non-Mendelian (or cytoplasmic) heredity, and were viewed as excellent experimental systems to demonstrate that Morgan's chromosomic theory could not account, giving no credit to cytoplasm, for a variety of phenomena that occur in the development and evolution of organisms. In the wake of Sonneborn's discovery (1937) of mating types in *Paramecium*, for long this ciliate represented the eukaryotic microorganism most used to assess experimentally the genetic mechanisms responsible for the inheritance of characters. Although this inheritance proved to depend on nuclear genes in a relevant number of cases, in others it clearly implied non-Mendelian mechanisms. One of the most obvious non-Mendelian traits was just represented by the mating types: the two opposite or complementary mating types of some species of *Paramecium* clearly denoted to be originated from identical genotypes and transmitted to sexual offspring through cytoplasm. To explain these and other observations relevant to the cytoplasmic inheritance of, for example, the "Killer" trait or the "Serotypes", it was thus necessary to postulate the existence of "Plasmagenes", i. e., cytoplasmic entities capable to autoduplicate and mutate genetically. In its most unifying version, this hypothesis admitted that some phenotypic traits could either be determined by nuclear genes, or by plasmagenes; the way by which these traits were transmitted to offspring would have been decided by which of the two determinants (the nuclear genes, or the plasmagenes) was currently at work in the strains used in the crosses. As it appeared evident that the killer trait is actually due to the presence of endosymbiotic bacteria multiplying in the cytoplasm, and the serotypes are identifiable with alternative patterns of expression of a specific set of nuclear genes encoding variant surface proteins, this hypothesis of the plasmagenes was placed at the margins of a research increasingly dominated by the Mendelian nuclear genetics. As a consequence, ciliates were perceived as "anomalous" microorganisms not recommended, as such, for being used in genetic studies. A substantial contribution to bring ciliates into a new age was provided by molecular biology that, starting from 1970, used them in fundamental discoveries, such as the telomerase activity, genome rearrangements, deviations from to universality of the genetic code, self-splicing introns. Some of these discoveries again implied the existence of non-Mendelian phenomena, that we now know to reflect homology-dependent maternal effects and the fact that cells by dividing

* Dipartimento di Biologia Molecolare Cellulare Animale, Università di Camerino, Camerino (MC) - E-mail: piero.luporini@unicam.it

inherit, in addition to the genome, also regulatory information that is extraneous to the genomic DNA. These effects are manifest in ciliates, like in other organisms, as a specific inhibition of the expression of a vast array of genes. Furthermore, they play a key role in programming the genome rearrangements that, at the beginning of every life cycle, occur in the somatic nucleus (macronucleus) developed from mitotic products of the zygotic nucleus.

Key words: Ciliated Protozoa, Genome rearrangements, Maternal effects, Non-Mendelian inheritance.

Introduzione (contesto storico).

Fenomeni epigenetici – fenomeni, cioè, che comportano cambiamenti ereditabili nella funzione ed espressione dei geni, senza che vi siano coinvolti anche cambiamenti di sequenza di DNA – sono comuni ad una vasta e diversa gamma di organismi. Tra questi, i ciliati in particolare rivestono un ruolo anche storico nel loro studio. Ben prima che l'avvento della genetica molecolare permettesse approcci sperimentali in grado di rivelarne cause ed effetti a livello molecolare, i ciliati hanno infatti avuto notevole popolarità come organismi che, più di altri, trasmettono vari caratteri mediante meccanismi genetici non convenzionali (non Mendeliani), così da essere spesso portati come esempi paradigmatici di una "heredity without genes" [12], o eredità citoplasmatica. La scoperta piuttosto precoce [16] dei "mating types" in *Paramecium* ha fatto sì che questo ciliato sia stato tra i primi organismi unicellulari ad essere comunemente utilizzato in analisi genetiche. Tuttavia, per un buon numero di caratteri che i parameci mostravano di trasmettere per via Mendeliana (cioè per mezzo di geni nucleari), un altrettanto significativo numero di caratteri rivelava un'eredità mediata da meccanismi che portavano ad inficiare la teoria cromosomica di Morgan come capace, da sola, di spiegare ogni aspetto della trasmissione ereditaria dei caratteri. Per quelli più complessi, associati a processi di sviluppo ed evolutivi, appariva necessario assegnare un ruolo centrale al citoplasma.

Tra i caratteri chiaramente non-Mendeliani di *Paramecium*, oltre ai "serotypes" (antigeni della superficie cellulare), la sensibilità al cloramfenicolo, il "killer-trait" (la produzione di un fattore tossico per cellule che non siano le stesse che lo producono), c'era il carattere "mating-type" stesso [11]. E i genetisti di *Paramecium* difficilmente potevano ignorare la trasmissione inequivocabilmente non-Mendeliana proprio di questo carattere. Incroci tra due ceppi parentali che complessivamente differivano per "mating type", sensibilità al cloramfenicolo, tipo di "serotype" e il "killer-trait" – con le cellule di un ceppo parentale caratterizzate da un "mating-type Odd", un antigene di tipo A, sensibilità al cloramfenicolo e con comportamento killer, e le cellule dell'altro ceppo parentale caratterizzate da un "mating-type Even", un antigene di tipo B, resistenza al cloramfenicolo e sensibilità alla tossina killer – fedelmente generavano una progenie con le stesse caratteristiche

distintive del proprio specifico ceppo parentale, senza che lo scambio nucleare interparentale producesse un qualche effetto. Inoltre, se venivano allestite condizioni sperimentali mirate a favorire un massiccio scambio interparentale di citoplasma (oltre che nucleare), il risultato era completamente diverso: la progenie non ripeteva più le caratteristiche distintive del proprio ceppo parentale, ma esprimeva tutta, pressoché omogeneamente, lo stesso "mating-type" (usualmente "Even"), tipo di antigene (indifferentemente A o B), resistenza al cloramfenicolo (se allevata in sua presenza), e comportamento killer.

Per spiegare queste incongruità dei ciliati con le regole della genetica Mendeliana fu proposta l'ipotesi dei "plasmageni": particelle (unità) citoplasmatiche capaci di autoduplicarsi e mutare [17]. Purtroppo per questa ipotesi, non tutti i plasmageni mostravano un'attività indipendente dai geni nucleari; anzi, appariva chiaro che mutazioni Mendeliane potevano abolirne la persistenza nel citoplasma e, in certi casi, la loro origine appariva riconducibile ai geni nucleari stessi. Nella sua formulazione più ampia questa ipotesi dei plasmageni giunse ad ammettere che la determinazione di alcuni caratteri fenotipici potesse implicare sia geni nucleari, sia plasmageni; la modalità di trasmissione ereditaria sarebbe poi dipesa da differenze interparentali tra i due determinanti [18].

Quando lo studio di questi casi di eredità non Mendeliana fu indirizzato a darne una spiegazione individuale, e non più collettiva, si capì che, ad esempio, il carattere killer è dovuto a batteri endosimbionti che si moltiplicano nel citoplasma delle cellule killer, e che i "serotypes" rappresentano isoforme stabili di proteine di membrana ognuna codificata da un gene di un stesso complesso genico. I casi non risolti, e tra questi quello dei mating type, contribuirono poi a mettere i ciliati in una prospettiva di organismi geneticamente "anomali", e a collocarli ai margini della ricerca genetica più attiva e d'avanguardia. A riportarli alla ribalta e dar nuova linfa all'interesse nei loro fenomeni epigenetici ha contribuito in modo decisivo il loro uso sperimentale in biologia molecolare, che ha portato a scoprire, tra l'altro, la struttura dei telomeri e delle telomerasi, le deviazioni del codice genetico, gli introni self-splicing, le riorganizzazioni del DNA di portata genomica. In relazione ad alcune di queste scoperte sono di nuovo venuti alla ribalta fenomeni di eredità non-Mendeliana, ora più specificamente caratterizzati e definiti come effetti "homology-dependent", o materni. Alla loro origine sta il fatto di portata generale che, nel dividersi, i ciliati (al pari di ogni cellula) si trasmettono, oltre al genoma, anche un'informazione molecolare regolatrice che non risiede nella sequenza stessa dei lori geni. Questa informazione, come è ora dimostrato soprattutto per merito di Meyer e collaboratori [10], può portare all'attivazione o disattivazione di una vasta gamma di geni e, inoltre, gioca un ruolo primario nel programmare le ristrutturazioni genomiche che si verificano all'inizio di ogni ciclo biologico. Per comprenderne la natura molecolare è necessario richiamare alcuni aspetti distintivi dei ciliati inerenti la loro organizzazione e biologia.

Organizzazione nucleare e eventi sessuali

I ciliati – oggi riunificati con apicomplessi e dinoflagellati nel clade degli Alveolata, emersi più o meno contemporaneamente alle piante e al clade degli Opistokonta (animali e funghi) in occasione del "Big Ban" dell' evoluzione eucariotica [14] – sono unici nell'aver separato funzioni somatiche e germinali tra due diverse linee nucleari note, rispettivamente, come macronucleare e micronucleare. Come illustrato in Fig. 1, oltre a coesistere in ogni cellula e condividere lo stesso citoplasma, queste linee si rinnovano a carico di prodotti mitotici di uno stesso nucleo zigotico (o synkaryon) in occasione di ogni evento sessuale, sia esso rappresentato dalla coniugazione che comporta scambio nucleare tra due cellule temporaneamente appaiate a formare coppie di coniuganti, o dall'autogamia che si compie a carico di una stessa singola cellula. I macronuclei somatici (uno o più per cellula) sono altamente poliploidi (in *Paramecium*, ad esempio, circa 1.000 *n*), di varia forma, e si dividono solo per amitosi poiché contengono cromosomi non interi, bensì frammentati fino a dimensioni (negli ipotrichi) di molecole "gene-size". Questi nuclei sono trascrizionalmente sempre attivi, ma ogni volta che la cellula

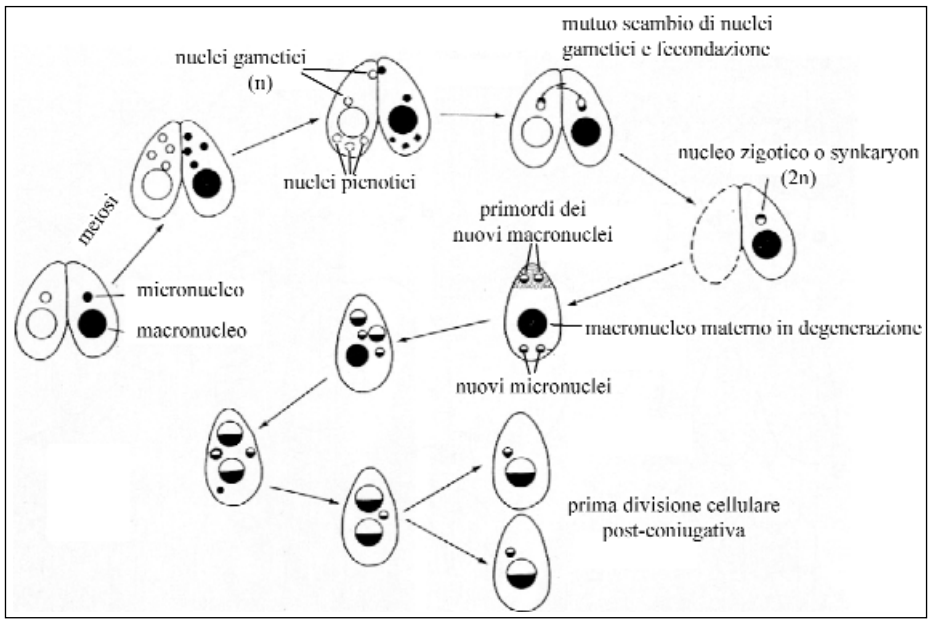

Fig. 1. Rappresentazione schematica (con riferimento a *Tetrahymena* il cui apparato nucleare si compone di un solo macronucleo ed un solo micronucleo) dei fenomeni nucleari che hanno luogo durante la coniugazione e negli stadi immediatamente successivi. I nuclei delle due cellule che entrano in coniugazione sono disegnati completamente bianchi, o completamente neri; quelli che si formano ex-novo al termine della coniugazione dai prodotti mitotici dei nuclei zigotici sono disegnati con una metà bianca e l'altra nera.

entra in coniugazione, o autogamia, vanno incontro a riassorbimento e sostituzione. Il loro contenuto genico non può, quindi, essere trasmesso per via sessuale alla progenie, che può solo ricevere l'RNA che i loro geni sintetizzano fin quando non è iniziata l'attività sintetica dei nuovi macronuclei. I micronuclei della linea nucleare germinale (anch'essi uno o più per cellula) sono invece rigorosamente diploidi, sferici, e si dividono per mitosi. Essi sono trascrizionalmente inerti e svolgono la loro unica funzione genetica, facendosi carico della meiosi, in occasione delle manifestazioni sessuali della cellula. Di tutti i loro prodotti meiotici aploidi ne sopravvive, tuttavia, solo uno per cellula che si divide ulteriormente per mitosi. I due prodotti si differenziano in nuclei gametici, uno dei quali ("migratorio" o "maschile") viene mutuamente scambiato (nel caso della coniugazione) tra i partner della coppia, e indirizzato a fondersi con l'altro ("stazionario" o "femminile") in un nucleo zigotico (o synkaryon). Per effetto di questo scambio nucleare, i due exconiuganti di ogni coppia dovranno necessariamente formare nuclei zigotici geneticamente identici. Ogni differenza fenotipica tra i due cloni (linee) cellulari da loro sviluppati sarà così indicativa di un effetto non-Mendeliano. Nel caso dell'autogamia che, come mostrato in Fig. 2, almeno in *Paramecium* si manifesta a carico di ciascuna cellula ex-coniugante, la formazione del nucleo zigotico deve necessariamente avvenire per cariogamia tra i due nuclei gametici prodotti da una stessa cellula; il genotipo di ogni cellula ex-autogamica sarà pertanto omozigote (con una segregazione 1:1 tra dominanti e recessivi). Questa proprietà di produrre genotipi interamente omozigoti con una sola generazione sessuale rende l'autogamia dei parameci un processo geneticamente unico.

Riorganizzazione del genoma macronucleare.

Molti sono gli organismi in cui lo sviluppo comporta profonde riorganizzazioni genomiche, ma forse in nessun caso il livello della loro complessità è paragonabile a quanto si osserva in occasione dello sviluppo e differenziamento del genoma macronucleare dei ciliati. La riorganizzazione di questo genoma, oggetto di varie review [ad esempio, 3, 8, 15, 19], interessa non meno di 6.000 siti in *Tetrahymena* e almeno 100.000 negli ipotrichi in generale, e determina una eliminazione di DNA (essenzialmente rappresentato da elementi trasponibili e sequenze ripetute) che, ad esempio in *Euplotes* e *Stylonychia* (i più noti ipotrichi), può essere della misura del 90-95% di tutto il DNA macronucleare della cellula. In ogni specie, essa si completa prima che il nuovo macronucleo abbia raggiunto il definitivo livello di poliploidia e si ripete fedelmente in tutti i suoi aspetti meccanicistici da una generazione sessuale alla successiva. Tra questi, due sono verosimilmente gli aspetti di portata più generale e dal loro studio è venuto il contribuito più significativo alla comprensione dei meccanismi molecolari responsabili degli effetti materni, o "homology-dependent", sull'espressione dei geni del nuovo macronucleo [10]. Uno riguarda la frammentazione dei cromosomi micronucleari in entità macronucleari

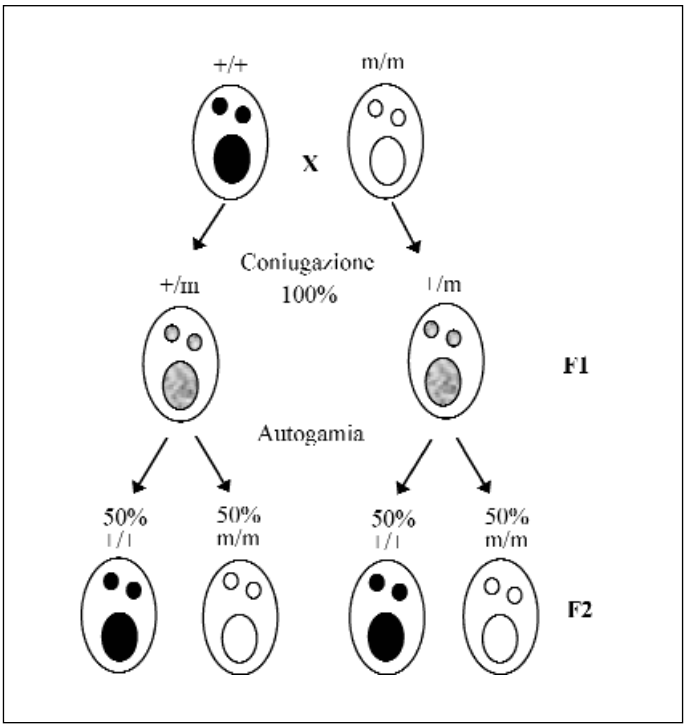

Fig. 2. Segregazione Mendeliana di una coppia di alleli in un incrocio tra cellule omozigoti wild-type (genotipo +/+) e mutanti (genotipo *m/m*) di *Paramecium aurelia*, il cui apparato nucleare si compone di un macronucleo e due micronuclei. La coniugazione porta alla formazione di nuclei zigotici identici nei due ex-coniuganti F_1 (genotipo *m*/+). L'autogamia dei cloni sviluppati da questi ex-coniuganti genera una discendenza F_2 completamente omozigote, che ha il 50% di probabilità di ricevere l'uno o l'altro degli alleli parentali *m* e +.

sub-cromosomiche, per ciascuna delle quali vengono sintetizzati ex-novo i telomeri che ne proteggono le due estremità. Questi sub-cromosomi macronucleari variano notevolmente di dimensioni tra una specie e l'altra, da circa 600 Kb in *Tetrahymena* a soli 2 Kb negli ipotrichi, nei quali ogni sub-cromosoma è di fatto rappresentato da un singolo gene e usualmente definito come molecola "gene-size". L'altro aspetto è rappresentato dalla precisa recisione e delezione di sequenze nucleotidiche dal genoma macronucleare note come IES (da "Internal Eliminated Sequences"). Queste IES sono ugualmente presenti nelle regioni codificanti e non-codificanti del genoma micronucleare e rappresentate, sia da elementi trasponibili relativamente lunghi (classificabili nella famiglia dei "mariner") e replicati in decine fino a migliaia di copie, sia da elementi non-codificanti a singola copia altrettanto numerosi (il genoma aploide di *Paramecium*, ad esempio, ne contiene circa 50.000).

Il paradigma della mutazione somatica "d-48" di Paramecium *ereditata per via materna*

La prima chiara dimostrazione di un effetto epigenetico, materno, sui fenomeni di riorganizzazione genomica peculiari dello sviluppo del macronucleo è legata alla disponibilità sperimentale di un ceppo variante di *Paramecium*, denominato d-48 [6]. Questo ceppo è incapace di esprimere il "gene *A*", uno della serie di geni codificanti i "serotypes", cioè le proteine antigeniche della superficie cellulare che, se riconosciute da specifici anticorpi, causano l'immobilizzazione delle cellule. Analisi genetiche ed esperimenti di mutuo scambio (mediante trapianto) del micronucleo tra cellule wild-type e d-48 hanno dimostrato che nel ceppo d-48 il gene *A* è presente nel micronucleo (il cui genoma è interamente wild-type) e assente nel macronucleo dal quale viene rimosso durante lo sviluppo [9]. Come schematizzato nella Fig. 3, nei ceppi wild-type il gene *A* è localizzato vicino all'estremità 5' di un cromosoma macronucleare che, nel frammentarsi nel corso dello sviluppo macronucleare, subisce tre diverse delezioni all'estremità 3' con relative aggiunte di telomeri a tre diverse altezze (8, 13 e 26 Kb a valle della posizione del gene). Al termine del suo sviluppo, ogni macronucleo wild-type contiene, quindi, tre isoforme di diversa lunghezza dello stesso cromosoma del gene *A*. Nel ceppo d-48, invece, il cromosoma del gene A subisce un'unica delezione terminale più estesa, che comporta la perdita del gene *A* stesso e la formazione del telomero all'altezza dell'estremità 5' della sequenza codificante. Come schematizzato nelle Fig. 4 A e B, sia i ceppi selvatici, sia il ceppo d-48 trasmettono fedelmente questi loro specifici pat-

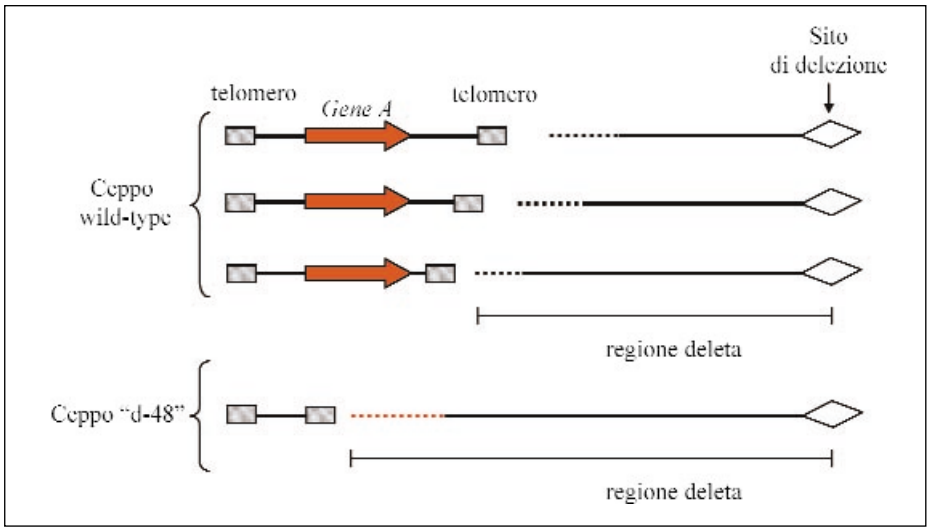

Fig. 3. Schema dell'organizzazione macronucleare del locus del gene *A* nei ceppi wild-type e d-48 di *Paramecium*. La sequenza codificante del gene *A* è rappresentata da una freccia, i box indicano l'aggiunta delle regioni telomeriche e la losanga indica il sito di delezione.

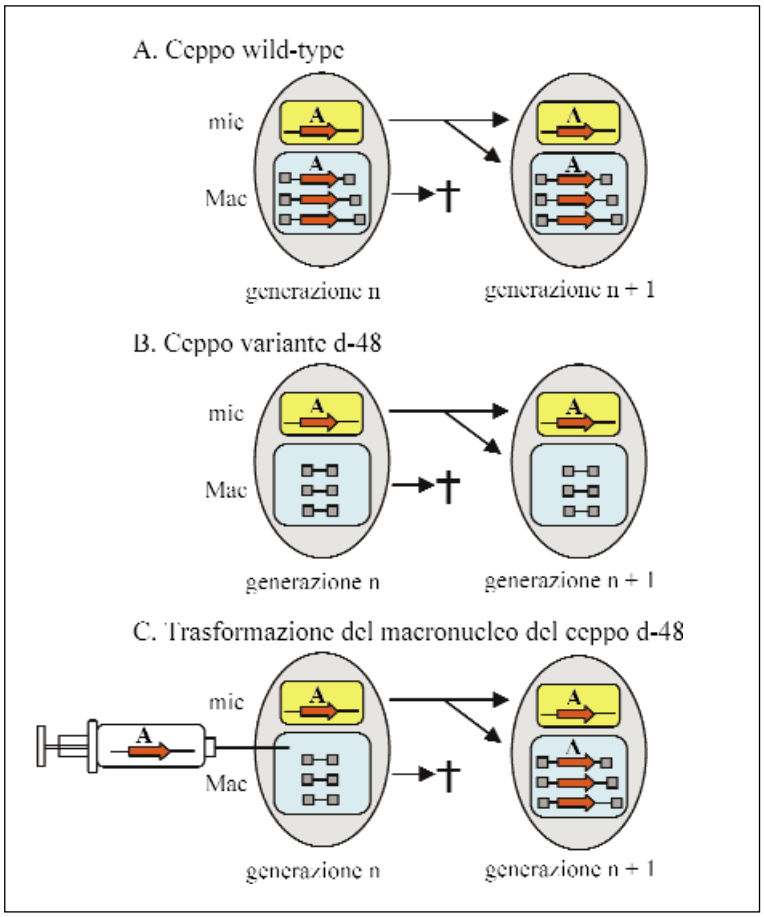

Fig. 4. Destino del gene *A* di *Paramecium* all'autogamia, in un ceppo wild-type (A) e nel ceppo d-48 (B). Sebbene il genoma germinale del micronucleo (mic) sia wild-type, il genoma somatico del macronucleo (Mac) mostra una delezione terminale del gene *A*. (C) La trasformazione del macronucleo di cellule d-48 con un plamide contenente il gene *A*, ne impedisce la delezione dal macronucleo dopo autogamia.

tern di delezione alle rispettive discendenze sessuali da autogamia. Diversamente, negli incroci tra un ceppo selvatico e il ceppo d-48, i due pattern non rivelano un'eredità mendeliana, bensì citoplasmatica materna. Per far luce sulla natura chimica del fattore citoplasmatico responsabile dell'effetto esercitato dal macronucleo materno su quello nuovo che si sviluppa in una cellula autogamica, si è proceduto a trasformare il macronucleo di cellule d-48 con un plasmide portante il gene *A* [20, 21]. Sebbene il plasmide venga alla fine perso con la degenerazione del macronucleo materno, come mostrato nella fig. 4 C, questa trasformazione determina una

reversione permanente del macronucleo di tipo d-48 in uno wild-type. Infatti il gene *A* della linea germinale (micronucleare) è amplificato nel nuovo macronucleo e mantenuto nelle successive generazioni sessuali. Il fattore "trans-acting" necessario per l'amplificazione del gene *A* appare essere un prodotto del gene *A* stesso, e il fatto che anche un frammento della sequenza codificante del gene *A* sia sufficiente a riparare il difetto delle cellule d-48 indica che questo fattore non può essere identificato né con il trascritto "full-length" del gene, né con la proteina da esso codificata. Le evidenze sperimentali più recenti, ottenute da studi condotti su *Tetrahymena* [1], oltre che su *Paramecium* [7, 13], convergono tutte nell'identificare gli RNA a doppio filamento, soggetti ad essere frammentati da ribonucleasi "Dicer-like" in subunità più piccole ("small" o "interference" RNA), come le molecole responsabili della comunicazione che intercorre tra il genoma macronucleare materno (parentale) e quello in sviluppo nella discendenza sessuale.

Una IES che in Paramecium *inibisce la propria eliminazione*

Come nel caso dell'eliminazione di DNA nel corso della frammentazione cromosomica, meccanismi epigenetici entrano in gioco anche nel regolare la rimozione di IES dai cromosomi destinati a formare il genoma macronucleare [4, 5]. Ne ha fornito una chiara dimostrazione soprattutto lo studio del "gene *G*" di *Paramecium*, un altro gene che codifica una proteina antigenica di superficie non essenziale per le cellule. Nei cromosomi della linea genomica micronucleare (germinale), questo gene contiene una IES di 222 bp che ne interrompe la sequenza codificante e ne determina, se non rimossa durante lo sviluppo macronucleare, una forma non funzionante. Come mostrato nelle Fig. 5 A e B, rimozione e ritenzione di questa IES si comportano da caratteri alternativi e incroci tra ceppi IES^- (che la rimuovono) e IES^+ (che la ritengono) ne hanno indicato una trasmissione per via materna e una determinazione da parte del macronucleo della cellula parentale. L'evidenza più diretta della correlazione di causa-effetto che intercorre tra la presenza della IES nel gene *G* del macronucleo materno e la sua ritenzione nel nuovo macronucleo della discendenza sessuale è stata ad ogni modo fornita da esperimenti di trasformazione del macronucleo di cellule IES^+ e cellule IES^-, condotti iniettando plasmidi portanti il gene *G* nelle sue due versioni IES^+ e IES^-. Come mostrato nella Fig. 5 C, dopo essere stata iniettata nel macronucleo di una cellula wild-type parentale, ogni sequenza del gene *G* (anche se incompleta nella sua regione codificante, e priva delle regioni regolatrici) si mantiene stabilmente, in vario numero di copie, nella discendenza sessuale di questa cellula, replicandosi autonomamente dopo che le sue due estremità si sono dotate di telomeri. Mentre nella discendenza delle cellule IES^- trasformate i plasmidi IES^- determinano la rimozione della IES, quelli IES^+ ne causano la ritenzione nella stessa discendenza. In conclusione, la IES micronucleare è ritenuta e amplificata nel nuovo macronucleo della discendenza sessuale solo se la sua controparte è presente anche nel macronucleo materno.

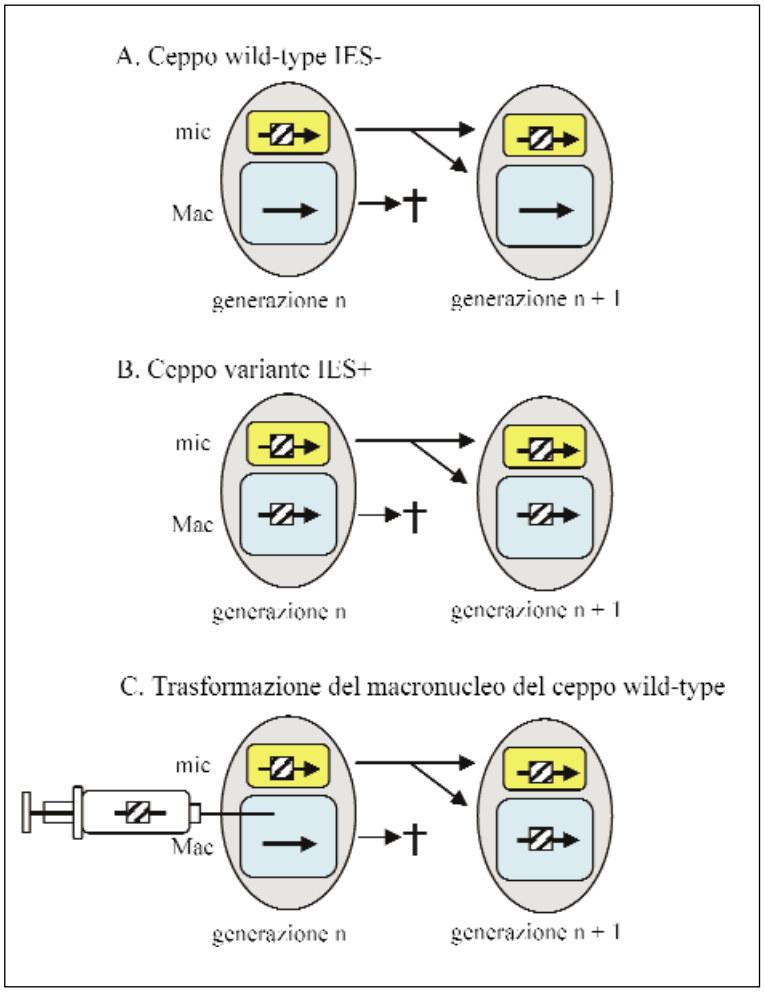

Fig. 5. Inibizione materna della recisione di una IES in *Paramecium*. (A) In un ceppo wild-type IES$^-$, la IES (indicata da un box) è rimossa dal gene *G* (raffigurato da una freccia) durante lo sviluppo del macronucleo (Mac). (B) Nel ceppo IES$^+$ la recisione della IES è specificamente inibita, sebbene il genoma germinale del micronucleo (mic) sia interamente wild-type. (C) La trasformazione di un macronucleo IES$^-$ con un plamide contenente la IES ne inibisce specificamente la recisione dopo autogamia.

Un'analoga inibizione epigenetica di rimozione di IES è stata dimostrata anche in *Tetrahymena*, di nuovo mediante trasformazione del macronucleo di cellule vegetative con microiniezione di due IES, denominate "M and R elements", allineate in posizioni cromosomiche adiacenti nel genoma micronucleare [2]. Sia l'iniezione dell'elemento R, sia di quello M determina la ritenzione dell'omologa IES nel genoma macronucleare della discendenza sessuale, e entrambi gli exconiuganti di coppie tra cellule trasformate e cellule wild-type danno discendenze indistintamente IES^+. Questo secondo fatto è di per se indicativo che il macronucleo parentale trasformato esercita la propria influenza sullo sviluppo di quello nuovo via citoplasma, poichè in *Tetrahymena* la coniugazione comporta un esteso scambio citoplasmatico tra i due partner di ogni coppia (differentemente da quanto avviene in *Paramecium* in cui questo scambio è di regola molto ridotto, o del tutto assente).

Anche queste osservazioni, al pari di quelle relative ai fenomeni di frammentazione cromosomica, pongono chiaramente il problema di natura biochimica e molecolare di come può una sequenza genica iniettata in un nucleo riconoscere specificamente una sua sequenza omologa residente in un altro nucleo, e determinarne poi la recisione, o la ritenzione. Per vario tempo sono stati confrontati, senza successo, due modelli per soddisfare questa domanda: uno basato sulla presunta azione mediatrice di fattori proteici sequenza-specifici, l'altro basato su presunte interazioni di appaiamento tra sequenze geniche a valle di fenomeni di fusione (peraltro mai citologicamente osservati, né in *Paramecium* né in *Tetrahymena*, durante un qualsiasi processo sessuale) di frammenti del macronucleo materno con quello in sviluppo. Evidenze sperimentali sempre più convincenti vanno ora a sostegno di un terzo modello centrato, come nel caso del controllo epigenetico dei fenomeni di frammentazione cromosomica, sulla classe delle piccole molecole di RNA a doppio filamento. Sintetizzate dalle IES nel nucleo materno, queste molecole migrano poi nel macronucleo in sviluppo e, qui giunte, interagiscono con le loro sequenze omologhe del genoma zigotico decidendone il destino.

Conclusioni

Lo studio, condotto principalmente in *Paramecium* e *Tetrahymena*, degli eventi di ristrutturazione genomica che si susseguono in un ordine rigidamente programmato durante lo sviluppo macronucleare, è stato tradizionalmente basato sull'assunto che successione e natura di questi eventi sono completamente codificati nella struttura del genoma germinale del micronucleo. Secondo i canoni classici della biologia molecolare, la riproducibilità di questi eventi era bene spiegata da un unico modello basato su elementi di sequenza "*cis*-acting" capaci di determinare l'attività specifica di fattori proteici "*trans*-acting". Solo pochi di questi elementi *cis*-acting sono stati tuttavia identificati. Ed è stato soprattutto il confronto tra sequenze omologhe germinali (micronucleari) e somatiche (macronucleari) a far emergere chiare difficoltà per spiegare la riproducibilità, di generazione in genera-

zione, sia dei meccanismi di recisione degli elementi IES, sia di frammentazione cromosomica. Dopo aver orientato l'attenzione su una programmazione epigenetica di questi vari fenomeni di riorganizzazione genomica e adottato una sperimentazione basata su esperimenti di trasformazione macronucleare, si può ora asserire con ragionevole certezza che la specificità di questi fenomeni risiede in una comunicazione essenzialmente mediata da piccole molecole di RNA a doppio filamento che, al pari di quanto avviene anche in altri organismi, sono deputate a muoversi dentro e fuori i nuclei per convogliare informazioni trans-nucleari e trans-cellulari, sequenza-specifiche.

BIBLIOGRAFIA

[1] Chalker D.L., Fuller P., Yao M.C., 2005. Communication between parental and developing genomes during *Tetrahymena* nuclear differentiation is likely mediated by homologous RNAs. Genetics, 169, 149-160.

[2] Chalker D.L., Yao M.C., 1996. Non-Mendelian, heritable blocks to DNA rearrangement are induced by loading the somatic nucleus of *Tetrahymena thermophila* with germ line-limited DNA. Molecular and Cellular Biology, 16, 3658-3667.

[3] Coyne R.S., Chalker D.L., Yao M.C., 1996. Genome downsizing during ciliate development: nuclear division of labor through chromosome restructuring. Annual Review of Genetics, 30, 557-78.

[4] Duharcourt S., Butler A., Meyer E., 1995. Epigenetic self-regulation of developmental excision of an internal eliminated sequence on *Paramecium tetraurelia*. Genes Development, 9, 2065-2077.

[5] Duharcourt S., Keller A.M., Meyer E., 1998. Homology-dependent maternal inhibition of developmental excision of internal eliminated sequences in *Paramecium tetraurelia*. Molecular and Cellular Biology, 18, 7075-7085.

[6] Epstein L.M., Forney J.D., 1984. Mendelian and non-mendelian mutations affecting surface antigen expression in *Paramecium tetraurelia*. Molecular and Cellular Biology, 4, 1583-90.

[7] Gratias A., Betermier M., 2003. Processing of double-strand breaks is involved in the precise excision of *Paramecium* internal eliminated sequences. Molecular and Cellular Biology, 23, 7152-7162.

[8] Jahn C.L., Klobutcher L.A., 2002. Genome remodeling in ciliated protozoa. Annual Reviews of Microbiology, 56, 489-520.

[9] Koizumi S., Kobayashi S., 1989. Microinjection of plasmid DNA encoding the A surface antigen of *Paramecium tetraurelia* restores the ability to regenerate a wild-type macronucleus. Molecular and Cellular Biology, 9, 4398-4401.

[10] Meyer E., Garnier O., 2002. Non-Mendelian inheritance and homology-dependent effects in ciliates. Advances in Genetics, 46, 305-337.

[11] Nanney D.L., 1980. *Experimental ciliatology.* John Wiley & Sons, 304 pp.

[12] Nanney D.L., 1985. Heredity without genes: ciliate explorations of clonal heredity. Trends in Genetics, 1, 295-298.

[13] Nowacki M., Zagorski-Ostoja W., Meyer E., 2005. Nowa1p and Nowa2p: novel putative RNA binding proteins involved in trans-nuclear crosstalk in *Paramecium tetraurelia*. Current Biology, 15, 1616-1628.

[14] Philippe H., Germot A., Moreira D., 2000. The new phylogeny of eukaryotes. Current Opinion in Genetics & Development, 10, 596-601.
[15] Prescott D.M., 1994. The DNA of ciliated protozoa. Microbiological Reviews, 58, 233-267.
[16] Sonneborn T.M., 1937. Sex, sex inheritance and sex determination in *Paramecium aurelia*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 23, 378-385.
[17] Sonneborn T.M., 1948. The determination of hereditary antigenic differences in genically identical *Paramecium* cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 34, 413-418.
[18] Sonneborn T.M., 1950. Partner of the genes. Scientific American, 183, 30-39.
[19] Yao M.C., Duharcourt S., Chalker D.L., 2002. Genome-wide rearrangements of DNA in ciliates. In *Mobile DNA II* (N.L. Craig, R. Craigie, M. Gellert, A.M. Lambowitz, eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., 730-758.
[20] You Y., Aufderheide K., Morand J., Rodkey K., Forney J., 1991. Macronuclear transformation with specific DNA fragments controls the content of the new macronuclear genome in *Paramecium tetraurelia*. Molecular and Cellular Biology, 11, 1133-1137.
[21] You Y., Scott J., Forney J., 1994. The role of macronuclear DNA sequences in the permanent rescue of a non-Mendelian mutation in *Paramecium tetraurelia*. Genetics, 136, 1319-1324.