

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М. В. ЛОМОНОСОВА  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**Кондукторова Виктория Владимировна**

**Исследование временного и пространственного распределения  
продуктов гена *germes* в овариальном фолликулогенезе *Xenopus laevis***

1.5.23 – Биология развития, эмбриология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
Кандидат биологических наук  
Никишин Д. А.

МОСКВА - 2024

## Оглавление

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 6

1.	ВВЕДЕНИЕ	7
1.1.	Актуальность темы исследования и современное состояние проблемы	7
2.2	Степень разработанности темы исследования	8
2.3	Цели и задачи	10
2.4	Научная новизна полученных результатов	10
2.5	Теоретическая и практическая значимость	11
2.6	Объект и предмет исследования	12
2.7	Методология исследования	12
2.8	Положения, выносимые на защиту	13
2.9	Степень достоверности и апробация результатов	13
2.10	Личный вклад автора	13
2.11	Публикации	14
2.12	Финансовая поддержка	14
2.13	Структура и объем диссертации	14
3	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
3.1	Структура фолликула и формирование фолликулярной оболочки <i>Xenopus laevis</i>	15
3.2	Половая плазма. Состав и формирование	21
3.3	Образование ППК у <i>Xenopus</i>	24
3.4	Гены-маркеры половой плазмы и первичных половых клеток	27
3.5	Локализация детерминантов в оогенезе – ключ полярности паттерна и будущего развития	30
3.6	Щелевые контакты ооцита и фолликулярных клеток – основа межклеточной коммуникации	38

3.7	Вклад фолликулярных клеток в процесс вителлогенеза	40
3.8	Роль фолликулярных клеток в стероидогенезе	45
4	МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	55
4.1	Реактивы	55
4.2	Лабораторное оборудование	56
4.3	Среды и растворы	57
4.4	Методы исследования	60
	Получение ооцитов и эмбрионов <i>in vitro</i>	60
	Получение проб из ооцитов и зародышей лягушек	61
	Получение и очистка антител	61
	Работа с ДНК и РНК	63
	Трансформация бактерий <i>E. coli</i> плазмидами	63
	Выделение плазмидной ДНК	64
	Рестриктная реакция	64
	Очистка фрагментов ДНК (ПЦР-продуктов, ДНК после реакции рестрикции, фрагмент ДНК в агарозном геле)	65
	Создание конструкторов для исследования элементов локализации в 3'НТО	65
	Молекулярное клонирование коротких последовательностей <i>germes</i> из разных амфибий	66
	Выделение тотальной РНК	66
	Синтез кДНК	66
	Синтез РНК для микроинъекций	67
	Создание флуоресцентных РНК зондов	67
	Спектрофотометрическое измерение концентрации ДНК или РНК	68
	Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле	68

Обратная транскрипция	68
ПЦР-амплификация и ПЦР-РВ	68
Секвенирование	71
Микроинъекции	71
Анализ элементов локализации 3'НТО	71
Гибридизация <i>in situ</i>	71
Гистологический анализ	73
In situ гибридизация для электронной микроскопии	74
Трансмиссионная электронная микроскопия	75
Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)	75
Работа с белками	75
Анализ специфичности антител	75
Электрофорез белков в ПААГ	76
Иммуноблоттинг	76
Конфокальная микроскопия	77
Сравнение и поиск нуклеотидных последовательностей	78
Анализ структуры белка	79
Статистический анализ	79
<b>5 РЕЗУЛЬТАТЫ</b>	<b>80</b>
5.1 Сопоставление содержания РНК и белка <i>Germes</i> в оогенезе и раннем развитии	80
5.2 Структурный анализ последовательности РНК и белка <i>Germes</i>	89
5.3 Исследование экспрессии <i>germes</i> в фолликулярных клетках	92
5.3.1 Продукты гена <i>germes</i> в фолликулярных клетках ооцита	92

5.3.2	Количественное соотношение мРНК <i>germes</i> в ооцитах и фолликулярных оболочках	98
5.3.3	Транскрипция гена <i>germes</i> в фолликулярных клетках	99
5.4	Филогенетический анализ гена <i>germes</i> среди видов амфибий отряда Anura	101
6	ОБСУЖДЕНИЕ	107
7	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
8	ВЫВОДЫ	118
9	ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ	119
10	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	120

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

DEPC-вода	вода, обработанная диэтилпирокарбонатом
dNTPs	смесь дидоксирибонуклеотидов
mQ-H <sub>2</sub> O	вода, очищенная с помощью ионообменной смолы, автоклавированная
RT	room temperature, комнатная температура
кДа	кило дальтон
кДНК	комплиментарная дезоксирибонуклеиновая кислота
МО	митохондриальное облако
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
ПП	половая плазма
ППК	первичные половые клетки
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНП	рибонуклеопротеид
ст.	стадия
ФК	фолликулярные клетки
ЭПР	эндоплазматический ретикулум

# 1. ВВЕДЕНИЕ

## 1.1. Актуальность темы исследования и современное состояние проблемы

Актуальность изучения генов половой плазмы у *Xenopus* проявляется в нескольких аспектах. Во-первых, шпорцевая лягушка *Xenopus laevis* является ключевым модельным организмом для изучения как фундаментальных вопросов эмбрионального развития, генетики, эволюции, так и прикладных, таких как изучение патологии и механизмов различных заболеваний у людей [Asashima et al., 2009; Aslan et al., 2017]. За последние 70 лет с использованием *Xenopus* сделано множество исследований и открытий, вследствие чего эти амфибии стали одной из доминирующих моделей во всем мире. Инъекция лягушке человеческого гонадотропина позволяет получать сотни зрелых крупных яйцеклеток в любое время года. Быстроразвивающиеся эмбрионы и короткий жизненный цикл, простота манипуляций и низкая стоимость содержания делают *Xenopus* исключительно ценной моделью. Несмотря на впечатляющие результаты в изучении раннего развития шпорцевой лягушки, наши знания о процессах органогенеза, в том числе развитие яичников и фолликулогенез в них, неполны.

Во-вторых, исследования механизмов спецификации клеток половой линии начались в 1950-х годах именно на зародышах *Xenopus*. Блэклер и Фишберг впервые продемонстрировали, что клетки эмбриона, содержащие половую плазму, отвечают за формирование гамет [Blackler, Fischberg, 1961]. Впоследствии такой путь спецификации первичных половых клеток стали называть детерминационным. Немного позднее, толчком в этих исследованиях послужили стремительно развивающиеся методы молекулярной биологии и генетики. Сх помощью в ооците были идентифицированы локализованные и распределенные мРНК, были изучены механизмы локализации РНК в оогенезе, а также проведен функциональный анализ этих мРНК и их роль в детерминации осей зародыша, зародышевых листков, а также выделения клона первичных половых клеток. Тщательный скрининг библиотек кДНК ооцита выявил отдельную группу мРНК, локализующихся на вегетативном полюсе яйца. Среди

них были выделены те, которые отвечают за раннюю дифференцировку зародышевых листков [Wylie et al., 1996], и те, с участием которых, формируется особая область цитоплазмы ооцита, называемая половой плазмой [Heasman et al., 1984; Savage, Danilchik, 1993]. Наследование материала половой плазмы отдельными клетками при дроблении зиготы бесхвостых амфибий делает их первичными половыми клетками [Houston, King, 2000a]. Проведено много исследований касательно влияния РНК и белков половой плазмы на формирование половых клеток [Берекеля и др., 2005; Houston, King, 2000b], их миграцию [Haston et al., 2009; Owens et al., 2017; Butler et al., 2017], и последующую внутриклеточную транслокацию материала половой плазмы [Colozza, Robertis, 2014; Oh, Houston, 2017b; Yamaguchi et al., 2013a]. Несмотря на обилие результатов, собрать их в единую целостную картину становления половой линии у *Xenopus* с участием материнских детерминант пока не удается.

А потому исследование белка *Germes*, транскрипт которого является компонентом половой плазмы (ПП), но также и соматических клеток яичника, способствует расширению наших знаний о механизмах формирования половой плазмы и развития половых клеток у важнейшего модельного организма. Исследование белка и открытие экспрессии гена *germes* в соматических клетках яичника способствуют расширению наших знаний о фундаментальных процессах фолликулогенеза шпорцевой лягушки.

## **1.2 Степень разработанности темы исследования**

Формирование половых клеток является сложным и не до конца изученным процессом, включающим в себя множество генетических, молекулярных и эволюционных событий, которые еще предстоит полностью раскрыть. С помощью методов молекулярной биологии и генетики исследуются механизмы обособления клона первичных половых клеток (ППК) у разных групп животных. Выяснилось, что магистральный путь формирования клона ППК в эволюции животных – индукционный, в то время как детерминационный, с участием



материнских детерминант половой плазмы, синтезированных во время оогенеза, возникал в эволюции много раз у разных групп независимо.

Взаимодействие мРНК и нетранслируемых РНК с белками формирует особую область в цитоплазме ооцита, которая отщепляется от цитозоля и называется половой плазмой. Ее наследование в развитии обеспечивает клетке приобретение уникального набора РНК и белков, который и позволяет ей в будущем стать половой. Анализ сложного взаимодействия РНК и белков и понимание функционирования всей машинерии является ключевой задачей в изучении становления половой линии. На сегодняшний день идентифицированы и в разной степени исследованы около 20 РНК и белков, составляющих ПП и ППК. Однако остается еще много неясного. Согласно транскриптомному анализу, ПП содержит примерно в 2 раза больше РНК и белков, а, следовательно, они не аннотированы и не определено их место и роль в формировании половой линии. А потому построить полную картину взаимосвязей и взаимодействий всех компонентов ПП и генов зародышевой линии пока невозможно.

РНК *germes* была впервые идентифицирована нами и является компонентом ПП. Ранее было показано, что эта мРНК является ранним маркером ПП и необходима для правильного формирования ППК. До этого исследования о синтезе белка *Germes* в оогенезе и раннем развитии известно не было. В данной работе описано получение антител, которые затем использовали для анализа наличия и локализации белка в оогенезе и раннем развитии *X. laevis*. По нашим результатам ген *germes*, не только маркер ПП. Помимо участия в формировании половой линии шпорцевой лягушки, он также экспрессируется в соматических клетках фолликула. Экспрессия в фолликулярных клетках не описана ни для одного другого маркера ПП. Филогенетическое исследование гена *germes* у видов из ближайших родов и семейств амфибий представляет интерес в связи с многократным возникновением в эволюционном ряду детерминационного пути обособления клона ППК.

### 1.3 Цели и задачи

**Цель** данной работы: исследовать временное и пространственное распределение продуктов гена *germes* в овариальном фолликулогенезе *Xenopus laevis*.

Для осуществления указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

- Сопоставить содержание РНК и белка Germes в оогенезе и раннем развитии *Xenopus laevis*;
- Провести структурный анализ последовательности РНК и белка Germes;
- Исследовать экспрессию *germes* в фолликулярных клетках;
- Провести филогенетический анализ гена *germes* среди видов амфибий отряда Anura.

### 1.4 Научная новизна полученных результатов

Данная работа имеет значительную научную новизну, поскольку представляет несколько новых исследований гена *germes*. Были впервые получены данные о синтезе и локализации белка. Выявлены различия в содержании мРНК и белка, в ходе развития зародышей *X. laevis*. Иммуноцитохимическое окрашивание антителами против белка Germes полученными нами, позволило выявить мигрирующие в гонаду ППК. Этот факт позволяет отнести данный белок к ранним маркерам половых клеток. Косвенно, это указывает на его функции в поддержании обособившейся линии половых клеток, что является важным моментом для понимания всего процесса.

Также в данном исследовании проведен анализ распространенности гена *germes* среди других животных, в частности бесхвостых амфибий, что является актуальным вопросом в исследовании фундаментальных аспектов онтогенеза. Поскольку большая часть описанных маркеров половой плазмы и половых клеток была исследована на модельных объектах, данных об их распространенности у видов из близких родов и семейств крайне скудны.

Одним из особых результатов исследования является обнаружение, что РНК и белок *Germes* синтезируются не только в ооцитах и ППК, но также в фолликулярных клетках, окружающих ооцит. Данные, что РНК и белок половой линии обнаружены в соматических клетках, являются уникальными и не описаны более ни для одного гена-маркера половой плазмы.

Таким образом, исследования, представленные в данной работе, дополняют сведения о гене половой плазмы и первичных половых клеток, что важно для построения целостной картины формирования половой линии в детерминационном пути. А также результаты работы выводят новые перспективы для дальнейших исследований в этой области.

### **1.5 Теоретическая и практическая значимость**

Диссертационная работа посвящена фундаментальному вопросу – изучению продуктов гена половой плазмы *germes* в ооцитах и соматических фолликулярных клетках яичника модельного объекта *Xenopus laevis*. Также проведен широкий анализ распространенности этого гена у других амфибий.

Теоретическая значимость этого исследования заключается в том, что оно расширяет наше понимание процессов развития половых клеток, о влиянии одного и того же гена на ооциты и соматические клетки яичника. Полученные данные позволяют углубить наши знания о молекулярных механизмах, лежащих в основе формирования половых клеток у животных.

Практическая значимость данного исследования состоит в том, что полученные данные могут быть использованы для обновления методических материалов и развития учебных практических курсов по биологии развития. Исследователи и студенты, работающие в этой и смежных областях, могут использовать результаты исследования для более полного и точного понимания этих процессов, что будет способствовать улучшению качества образования.

## 1.6 *Объект и предмет исследования*

Основной объект исследования данной работы – шпорцевая лягушка *Xenopus laevis* (Daudin). *X. laevis* является лабораторным видом и содержится на кафедре эмбриологии МГУ. В экспериментах использовали ооциты, а также эмбрионы различных стадий развития. Для филогенетического исследования распространенности гена среди других амфибий использовали: малую шпорцевую лягушку *Silurana (Xenopus) tropicalis*, жабу *Bufo Bufo*, травяную лягушку *Rana temporaria*, жерлянку *Bombina bombina*, малую когтистую лягушку *Hymenochirus boettgeri*. Лягушки были приобретены в зоомагазине и определены до вида по ключу [Terent'ev, Chernov, 1965].

Предметом настоящей работы стало исследование продуктов гена *germes* в оогенезе и раннем развитии шпорцевой лягушки, а также их распространенности среди других амфибий.

## 1.7 *Методология исследования*

В основе данной работы лежат современные методы биологии развития, молекулярной биологии, цитологии. Поликлональная сыворотка получена с помощью биохимических методов и методов молекулярной биологии. Анализ экспрессии гена был проведен с помощью количественной ПЦР в реальном времени, *in situ* гибридизации с окраской ультратонких срезов антителами, меченными коллоидным золотом. Содержание и локализация белка исследовано с помощью Вестерн-блоттинга и иммуноцитохимии. Рекомбинантные ДНК-конструкты выполнены с помощью методов молекулярного клонирования. Анализ распространенности гена среди бесхвостых амфибий был проведен с помощью биоинформатических методов и метода молекулярного клонирования.

## **1.8 Положения, выносимые на защиту**

- Germes является ранним маркером половой плазмы и первичных половых клеток;
- Ген *germes* экспрессируется не только в ооците, но и в соматических клетках фолликула;
- Ген *germes* является филогенетически узко представленным, только внутри семейства Pipidae.

## **1.9 Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием протоколов, опубликованных в зарубежных рецензируемых журналах. Все данные получены в экспериментах, методики которых соответствуют современным правилам проведения исследований. Все эксперименты были проведены в нескольких повторностях.

Результаты исследований были представлены на российских и международных конференциях: XV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2008), IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), Конференция «Морфогенез в индивидуальном и историческом развитии» (Москва, 2011), Конференция-школа с международным участием «Актуальные проблемы биологии развития» (Москва, 2019), Юбилейная научная конференция «Николай Константинович Кольцов и биология XXI века» (Москва 2022), Ломоносовские чтения (Москва, 2022).

## **1.10 Личный вклад автора**

Автор самостоятельно ставил задачи, планировал и выполнял все эксперименты в рамках данной работы. Автор в полной мере освоил использованные в работе методики. Автор принимал активное участие в обсуждении результатов, самостоятельно выбирал методики для поставленных

задач. Автором была написана большая часть текста опубликованных статей и подготовлены иллюстрации.

### **1.11 Публикации**

По теме диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М. В. Ломоносова по специальности и отрасли наук.

### **1.12 Финансовая поддержка**

В рамках Государственного задания МГУ имени М. В. Ломоносова №09-04-01444-а, № 30-2-21.

### **1.13 Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 155 страницах машинописного текста, содержит 21 рисунок и 2 таблицы.

## 2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1 Структура фолликула и формирование фолликулярной оболочки

#### *Xenopus laevis*

Половые валики, из которых развиваются яичники, обнаруживаются у шпорцевой лягушки во время метаморфоза (стадии 50-54). Они закладываются как парные органы размером 2 мм на 0.7 мм. Яичники образуются из промежуточной мезодермы рядом с мезонефросом в виде эпителиального полового валика [Ogielska, Kotusz, 2004; Rasar, Hammes, 2006]. В формирующемся яичнике выделяются две зоны – медуллярная (мезенхимальная) и кортикальная [Merchant-Larios, Villalpando, 1981; Iwasawa, Yamaguchi, 1984; Tanimura, Iwasawa, 1988; Falconi et al., 2001]. ППК женской особи заселяют кортикальный слой развивающейся гонады, после чего их развитие идет в окружении мезенхимальных клеток развивающегося яичника. ППК проходят цикл последовательных митотических делений, в результате чего формируется большое количество оогоний. Пока не известно, что регулирует количество этих делений, прежде чем они вступят в мейоз [Kloc et al., 2004a, b].

Оогонии, вступившие на путь дифференцировки, проходят четыре последовательных митотических деления. На данном этапе у многих беспозвоночных и позвоночных животных митотические деления часто сопровождаются неполным цитокинезом. Вследствие этого формируется кластер из 16 половых клеток внутри цисточитов, связанных между собой межклеточными мостиками или кольцевыми каналами. Этот синцитиальный кластер называется цистой [Matova, Cooley, 2001; Repling et al., 1999]. Пространственная организация и механизмы, управляющие формированием разветвленной геометрии цисты, поразительно схожи у насекомых (*Drosophila*) и позвоночных животных, включая *Xenopus* [Kloc et al., 2004]. Просвет межклеточного мостика после первого митотического деления заполняется фузмой, богатой спектрином органеллой, специфичной для клеток зародышевой линии [Lin et al., 1994; Snapp et al., 2004]. Фузомы сливаются и образуют

полифузому, которая проникает во все мостики внутри кластера. Поскольку полифузома связывает и закрепляет полюса митотических веретен, она, таким образом, вовлечена в установление ориентации митотических делений [Grieder et al., 2000]. Цистоциты морфологически имеют грушевидную форму, в структуре цисты они направлены узким концом к центру [Kloc et al., 2004]. На стадии 16-клеточной цисты оогонии переходят к мейотическому делению созревания.

Какие факторы влияют на переход от митотического деления оогониев на мейотическое деление созревания у шпорцевой лягушки пока не установлено. Однако на млекопитающих было определено, что такими факторами являются STRA8 и MEIOSIN [Anderson et al., 2008; Oatley, Griswold, 2020]. Более того, исследования Исигуро показали, что у человека, крысы, а также рептилий и рыб есть локус в геноме, кодирующий предполагаемые гомологичные белки MEIOSIN [Ishiguro et al., 2020]. Вероятно, у позвоночных MEIOSIN является одним из важных консервативных элементов, запускающих мейоз в половых клетках.

Стадию первой мейотической профазы цистоциты в яичнике лягушонка проходят синхронно [Kloc et al., 2004]. Эпителиальные клетки кортекса окружают цисты и отдельные цистоциты, образуя префолликулярные оболочки [Ogielska, Kotusz, 2004]. К поздней пахитене ооциты отделяются друг от друга префолликулярными клетками и теряют связь друг с другом через цитоплазматические мостики. Дальнейшее развитие первичных фолликулов происходит асинхронно [Coggins, 1973].

У *Xenopus* каждый из 16 цистоцитов дает начало ооциту, в отличие от млекопитающих, где на мыши было показано, что лишь 33% всех оогоний выживает, и они формируют первичные фолликулы [Pepling, Spradling, 2001], а прочие претерпевают апоптоз. Для визуализации апоптотических клеток в яичнике шпорцевой лягушки был применен метод окрашивания TUNEL [Veenstra et al., 1998]. Апоптотические клетки были обнаружены в кортикальной зоне яичника, и они располагались вне цист [Kloc et al., 2004]. Предположительно, апоптозу подвержены преимущественно префолликулярные клетки.



Оогонии обнаруживаются в только сформированном яичнике головастика *Xenopus* на стадии 54. Оогонии на этой стадии располагаются в кортикальной области гонады и имеют размер 17-24  $\mu\text{m}$  в диаметре. Каждый оогоний окружен небольшим количеством уплощенных фолликулярных клеток (ФК), которые тесно прилегают к клеточной мембране оогония. У взрослых животных оогонии присутствуют в виде кластеров в корковом слое яичника. Гранулы пигмента еще не обнаруживаются [Al-Mukhtar, Webb, 1971]. После завершения митотических делений оогоний становится ооцитом, ядро которого находится на стадии первой мейотической профазы.

Развитие ооцитов шпорцевой лягушки условно разделяют на 6 стадий [Dumont, 1978]. Рост ооцитов *X. laevis* от стадии I (самый маленький и прозрачный ооцит) до стадии VI, окруженных полноценной фолликулярной оболочкой, состоящей из нескольких слоев, требует более восьми месяцев. Зрелый ооцит окружен желточной оболочкой, слоем фолликулярных клеток и соединительно-тканый слоем теки. В состав вторичного фолликула входит ооцит и оболочки соматического происхождения. Прилегающий к ооциту слой клеток образует первую оболочку фолликула, которая является производным эпителиального компартмента яичника. Затем расположены слои клеток теки – уже мезенхимального происхождения [Wallace, Selman, 1990; Ogielska, Kotusz, 2004].

На стадии I в начале цитоплазматического роста (диаметр 0,05-0,3 мм), уплощенные фолликулярные клетки тесно соприкасаются с плазматической мембраной ооцита. Между собой ФК соединяются адгезионными контактами и десмосомами [Dumont, Brummett, 1978; Wallace, Selman, 1990]. К концу I стадии ооцит и фолликулярные клетки формируют навстречу друг другу цитоплазматические выросты, и фолликулярные клетки приподнимаются над поверхностью ооцита, формируется периооцитное пространство. Между ооцитом и ФК формируются неспециализированные контактные зоны с расстоянием между мембранами 20 нм и более [Browne, Werner, 1984]. Наличие щелевых контактов на этой стадии достоверно не установлено.

На стадии II (0,3-0,45 мм) в слое теки увеличивается количество коллагена, а слой фолликулярных клеток утолщается. Количество и длина микровилл на поверхности ооцита растет, при этом плазматическая мембрана образует эндоцитозные инвагинации между выростами. Микровилли и инвагинации значительно увеличивают площадь поверхности ооцита. Фолликулярные клетки утолщаются, и на их поверхности, обращенной к ооциту, формируются макровилли, в количестве 50-70 штук на клетку (наши неопубликованные данные). В результате слой ФК приобретает арочный вид. Морфологически между ооцитом и ФК впервые удается идентифицировать щелевые контакты [Browne, Werner, 1984], создается основа для прямой метаболической кооперации. В периооцитном пространстве островками начинает формироваться желточная (вителлиновая) оболочка [Dumont, 1972]. По современным данным, в состав желточной оболочки амфибий входят 6 (возможно, 7) различающихся по молекулярной массе гликопротеинов со сходной доменной структурой входящих в них белков [Harris et al., 1994; Hedric, 2008]. Различными методами было показано, что компоненты оболочки у амфибий синтезируются ооцитом [Yamaguchi et al., 1989; Kubo et al., 1997; Yang, Hedrick, 1997; Kubo et al., 2000], тогда как у костистых рыб в состав желточной оболочки входит белок, синтез которого индуцирован эстрогеном в печени [Hamazaki et al., 1987]. Синтез компонентов желточной оболочки в ФК до сего времени не показан.

У некоторых амфибий на превителлогенных стадиях была обнаружена гетерогенность ФК. У рогатки Кранвелла (*Ceratophrys cranwelli*) различают светлые и более крупные темные ФК, ультраструктура которых указывает на высокую синтетическую активность. Цитоплазма включает в себя большое количество свободных рибосом и шероховатого эндоплазматического ретикулума, скопления гликогена и везикул с электронно-плотными частицами [Villicco et al., 2007].

При исследовании фолликулов у червяг *Ichthyophis tricolor* и *Gegeneophis ramaswamii* [Beyo et al., 2007] авторы разделили ФК на темные и светлые, основываясь, прежде всего, на структуре хроматина. В ядрах темных клеток

хроматин находится преимущественно в неактивном конденсированном состоянии, в отличие от светлых клеток с деконденсированным эухроматином. С развитием ооцита все ФК становятся темными. Эта гетерогенность ФК у некоторых амфибий, по-видимому, связана с различиями в их синтетической активности.

На стадии III (0,45-0,6 мм) тека прорастает кровеносными сосудами, и ооцит активно акцептирует и аккумулирует желток. ФК увеличиваются в объеме. Желточная оболочка к этой стадии образует непрерывный слой в периооцитном пространстве. Микро- и макровилли пронизывают ее, сохраняя прямые контакты ооцита и фолликулярных клеток.

К стадии IV (0,6-1 мм) скорость вителлогенеза достигает своего максимума. Ооциты этой стадии покрыты хорошо развитой сетью сосудов. Объем ФК продолжает расти, увеличивается объем ядра и ядрышка, что указывает на рост синтетической активности в них. С ростом ооцита на стадиях IV-V (1-1,2 мм) между ФК возникают промежутки, адгезионные контакты сохраняются на выростах ФК. Трансэпителиальные каналы позволяют свободно проходить вителлогенину и другим макромолекулам из капиллярной сети к ооциту. Желточная оболочка достигает к этой стадии своей максимальной толщины, при этом многочисленные щелевые контакты между отростками ооцита и ФК сохраняются (Рис. 1).

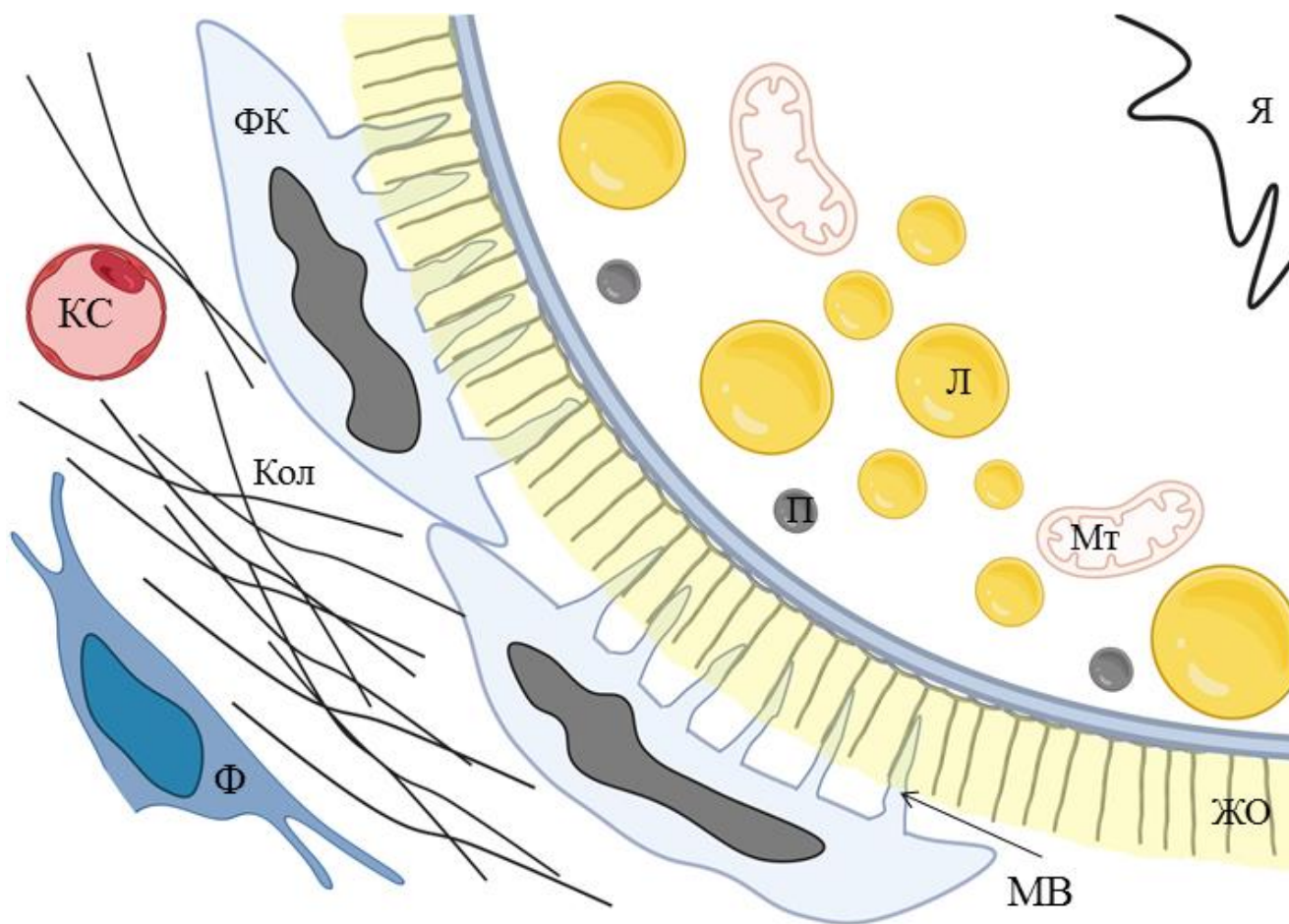
К стадии VI (1-1,3 мм) вителлогенез завершается. Микро- и макровилли заметно деградируют. Слой фолликулярных клеток становится тоньше. На этой стадии количество ФК достигает 10-14 тысяч на ооцит, а плотность фолликулярных клеток составляет примерно 32 на  $10000 \mu\text{m}^2$  поверхности ооцита шпорцевой лягушки [Miledi, Woodward, 1989].

Ультраструктура ФК зрелых ооцитов амфибий была исследована в ряде работ [Dumont, Brummett, 1978; Browne, Werner, 1984; Hsü et al., 1985, Vilecco et al., 2007]. Митохондрии в фолликулярных клетках имеют трубчатую форму. Комплекс Гольджи хорошо развит и часто расположен группами вблизи ядра. Шероховатый эндоплазматический ретикулум с рибосомами обычно выглядит

как несколько коротких сегментов. В клетках много гладкого эндоплазматического ретикулума. В цитоплазме есть жировые капли, которые могут содержать электронноплотные включения. Имеются многочисленные везикулы как в цитоплазме, так и открывающиеся наружу, а также мультивезикулярные тельца. Всё перечисленное характерно для клеток, синтезирующих стероидные гормоны.

Когда сформировался фолликул, наступает блок мейоза ооцита на стадии диплотены. Во время этой длительной остановки ооцит растет, накапливает молекулярные резервы и приобретает свою компетентность для завершения двух мейотических делений, оплодотворения и развития.

Изменения в морфологической структуре фолликулов на превителлогенных, вителлогенных стадиях и в процессе созревания коррелирует с молекулярными процессами, идущими в ооците, ФК и теке, и отражают их взаимное влияние. Исследования, проведенные в ряде биологических систем, показали, что взаимодействие сомы и половых клеток играет важную роль как в половой линии, так и в физиологических функциях половозрелой гонады [Gilula et al., 1978; Morgan, Mahowald, 1996]. Известно, что именно ФК влияют и управляют вместе с ооцитом на его рост, накопление желтка, поддержание мейотического блока и созревание [Gard, 1999; Jesus, Ozon, 2004]. Однако конкретные молекулярные и клеточные механизмы воздействия ФК на эти процессы продолжают активно исследовать до сих пор.



**Рисунок 1.** Строение фолликула *Xenopus* на стадии IV.

Я- ядро ооцита, Мт – митохондрии, Л – липидные капли, П – пигмент, ЖО – желточная оболочка, ФК – фолликулярные клетки, Кол – коллаген, Ф – фибробласт, Кс – кровеносный сосуд, МВ - макровилли. Макровилли фолликулярных клеток взаимодействуют контактами с микровиллиями ооцита.

## 2.2 Половая плазма. Состав и формирование

Особые РНК, определяющие детерминацию первичных половых клеток (ППК), концентрируются в вегетативном кортексе II-III стадии оогенеза *Xenopus* в виде особой цитоплазматической структуры, которая называется половой плазмой (ПП) (Рис. 2). ПП у амфибий была впервые описана Бунуром в 1939 году, который и ввел данный термин [Bounoure, 1934]. Анализ судьбы материала ПП в развитии показал, что в конечном итоге он вошел в состав примордиальных половых клеток. Трансплантация ПП индуцирует дополнительные ППК, тогда как удаление ПП приводит к потере гамет и стерильности [Ikenishi et al. 1974; Smith, 1966; Whittington, Dixon, 1975; Zust, Dixon, 1975; Kobayashi et al., 1994]. Таким

образом, ПП необходима и достаточна для спецификации половых клеток [Tada et al, 2012]. Более того, трансплантация ПП индуцирует дополнительные ППК даже в тех участках эмбриона, в которых обычно данные типы клеток не формируются. Причем ПП способна индуцировать судьбу половой клетки в любой клетке, независимо от ее положения внутри будущей ППК [Jamieson-Lucy, Mullins, 2019].

ПП определяет идентичность ППК как клеток зародышевой линии. Поскольку во время оогенеза компоненты ПП локализируются на вегетативном полюсе, наряду с соматическими детерминантами, она защищает ППК от соматической дифференцировки. ПП инициирует уникальную программу экспрессии генов, которая обеспечивает тотипотентное состояние ППК [Lai, King, 2013; Venkatarama et al., 2010]. Выявлено несколько параллельных механизмов, защищающих ППК от соматической дифференцировки. Если материнские мРНК зародышевой линии транслируются, то соматические детерминанты энтодермы, наоборот, подвергаются трансляционной репрессии. Кроме того, имеет место временное общегеномное подавление транскрипции других мРНК до завершения средне-бластульного перехода [Aguero et al, 2017]. Так программы соматической дифференцировки в ППК остаются неактивными, тогда как зиготическая транскрипция инициируется в остальной части эмбриона.

В состав ПП входят мРНК, белки, митохондрии, ЭПР, гранулярно-фибрилярный материал. ПП формируется из субклеточной структуры митохондриального облака с дополнительным включением РНК и белков. На стадии III ооцита ПП локализуется сначала в виде диска на вегетативном полушарии, а затем в виде небольших островков в кортексе (со стадии IV) [Kloc et al., 2001]. В созревшем ооците шпорцевой лягушки ПП обнаруживается также в виде крупных островков в кортексе вегетативного полюса. Открыто и описано более 20 РНК и белков, входящих в состав половой плазмы *Xenopus*. Однако транскриптомный анализ мРНК первичных половых клеток показал, что их должно быть около 50 [Butler et al., 2017]. В литературе описаны РНК и белки ПП: XCat-2, Xpat, Germes, Xlsirts, Xdazl, DEADSouth, Dead end, Hermes, Vasa, Xwnt11,

fatVg, B7/Fingers, C10/XFACS и другие [King et al., 2005; Tarbashevich et al., 2007; Colozza, De Robertis, 2014].

Вопрос формирования ПП как отдельной субклеточной структуры, не имеющей мембраны, но содержащей в своем составе мембранные органеллы (ЭПР, митохондрии) долгое время оставался открытым. Существуют данные, свидетельствующие о том, что отделение такого цитоплазматического компартмента происходит за счет физико-химических механизмов разделения фаз. Пионерская работа на *C. elegans* показала, что половые гранулы организованы как биомолекулярные конденсаты, возникающие в результате фазового разделения [Brangwynne et al., 2009]. Разделение фаз может происходить, когда взаимодействия между молекулами (например, белками) термодинамически более выгодны, чем взаимодействия между этими молекулами и их растворителем (цитозолем) [Banani et al., 2017]. Исследование фазовых свойств биомолекул позволило создать новую биофизическую основу для описания того, как происходит регуляция состава клеточных компартментов. Они концентрируют специфические биомолекулы и модулируют внутреннюю биохимическую активность без использования мембранных структур.

В результате разделения фаз формируется также и МО, предшественник ПП, тоже представляющий собой не связанный с мембраной компартмент. Считается, что МО и ПП являются более плотными структурами по сравнению с другими компартментами, формирующимися через разделение фаз. МО содержит РНК, белки, митохондрии и ЭПР [Kloc et al., 2014]. Также МО способно динамически реорганизовываться в течение оогенеза, что и происходит во время его транслокации на вегетативный полюс на III стадии оогенеза. Известно, что самосборка этой структуры происходит под действием N-концевого домена белка Xvelo. *In vivo* и *in vitro* он способен формировать амилоидоподобные структуры [Voke et al., 2016]. Xvelo является каркасом в формировании структуры МО, а затем и ПП. С митохондриями белок способен взаимодействовать N-концевым доменом, а с мРНК *nanos1* – через предполагаемый C-концевой РНК-связывающий домен [Voke et al., 2016]. Последовательность белка содержит

неупорядоченные домены низкой аминокислотной сложности. Такие домены встречаются в многочисленных РНК-связывающих белках, которые опосредуют образование капель жидкого гидрогеля [Kato, McKnight, 2016].

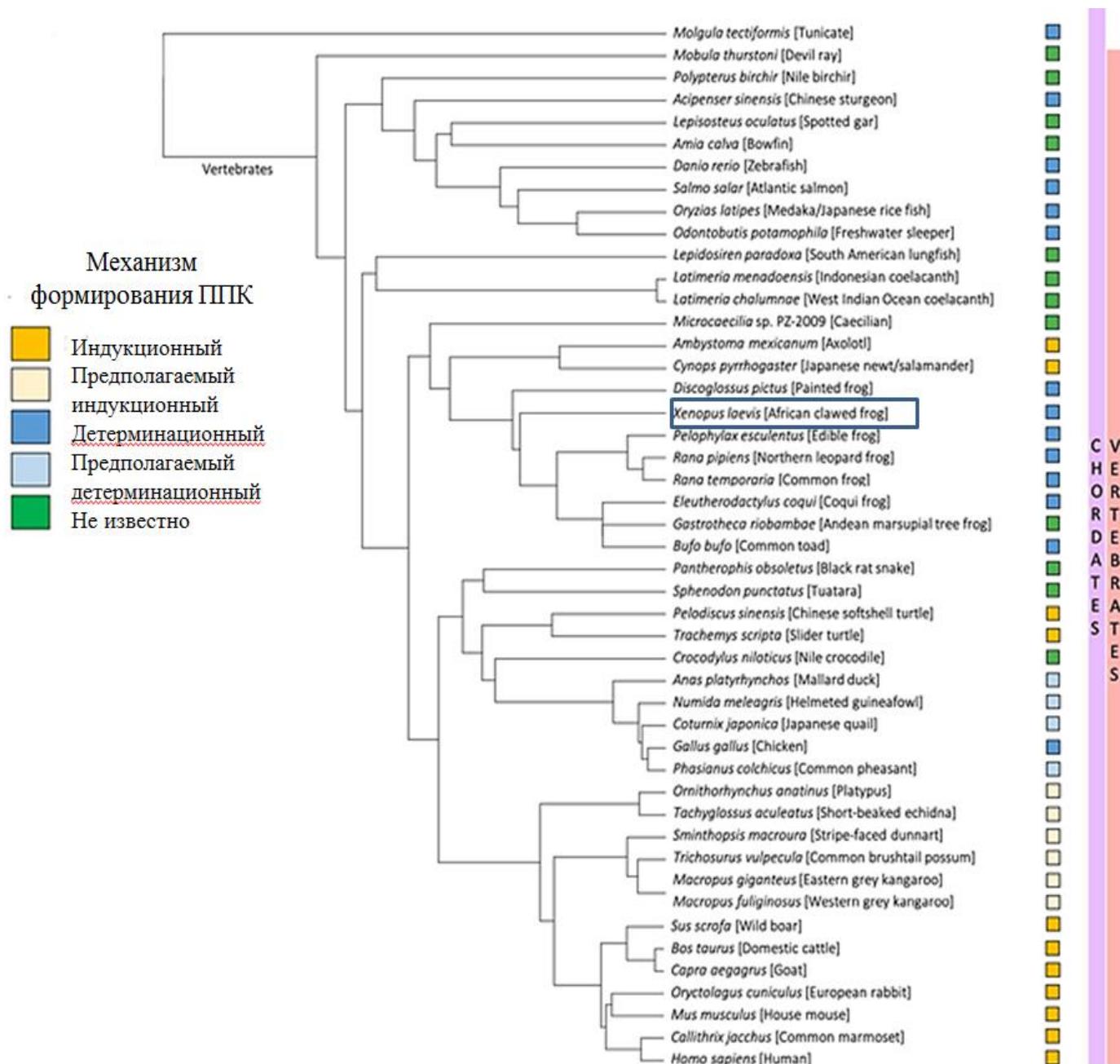
Поскольку на сформировавшийся каркас белков МО приходят и взаимодействуют с ним другие мРНК, есть работы, исследующие влияние энергетического состояния ооцита на эффективность локализации. Так, повышение температуры или концентрации АТФ внутри ооцита увеличивает скорость локализации мРНК в МО *Xenopus*. И наоборот, истощение запасов АТФ, кинезина II или понижение температуры снижает скорость локализации мРНК. Есть исследования, показывающие, что процесс агрегации и слияния ПП зависит от белка *Xklp1*, который принадлежит к семейству АТФ-зависимых кинезиноподобных моторных белков [Robb et al., 1996]. И наоборот, истощение запасов АТФ, кинезина II или понижение температуры уменьшает накопление мРНК *nanos* [Heinrich, Deshler, 2009]. Поэтому, возможно, в локализации мРНК кроме физико-химических свойств самих РНК, также может участвовать активный транспорт. Хотя изменение температуры, доступности энергии или количества моторных белков может просто увеличивать или уменьшать количество мРНК путем их более быстрого перемещения в цитоплазме и повышения вероятности того, что они столкнутся с МО и окажутся связанным с ним. А уже после, РНК, свойства которых (мотивы локализации или физико-химические) не позволяют им удержаться в МО, могут покинуть его. Для МО также известен определенный набор мРНК у *Xenopus*.

### **2.3 Образование ППК у *Xenopus***

Половые клетки выделяются как независимая, зародышевая линия клеток, когда их непосредственные предшественники, ППК обособляются во время эмбриогенеза. Как ни странно, механизмы, которые управляют спецификацией ППК, не являются консервативными в животном царстве, а в некоторых случаях даже между близкородственными видами. Образование ППК из материнских детерминант (прежде всего, ПП) является одним из двух основных



существующих способов образования гамет у животных (Рис. 2). Этот путь часто называют детерминационным или преформизмом. При данном механизме половые клетки наследуют синтезированные во время оогенеза функциональные материнские цитоплазматические детерминанты. К ним относятся различные РНК, белки и РНП, которые придают клеткам, их унаследовавшим, характеристики половых клеток [Houston, King, 2000a]. При втором механизме половые клетки возникают *de novo* в результате индукционных взаимодействий между соматическими клетками, часто под действием BMP на ранних стадиях развития [Johnson, 2011; Lawson et al., 1999]. Для бесхвостых амфибий, многих насекомых, рыб, птиц, червей характерен первый, детерминационный путь [Houston, King, 2000; Raz, 2003; Nakamura, Seydoux, 2008], тогда как хвостатые амфибии, млекопитающие, рептилии используют индукцию.



**Рисунок 2.** Пути формирования первичных половых клеток у разных групп животных [Hansen, Pelegri, 2021]. Шпорцевая лягушка выделена рамкой.

Как уже было сказано ранее, у шпорцевой лягушки детерминанты концентрируются преимущественно в ПП на вегетативном полюсе ооцита. После оплодотворения ПП собирается в агрегаты, которые выстраиваются вдоль борозд дробления [Savage, Danilchik, 1993; Кюс et al., 2001; Oh, Houston, 2017b]. Однако только некоторые вегетативные бластомеры при дроблении наследуют материал ПП, поскольку материал распределяется между клетками асимметрично, и попадает только в один дочерний бластомер. В результате только некоторые

бластомеры содержат агрегаты ПП, и они в дальнейшем сформируют половые клетки. На этой стадии они называются первичными половыми клетками (ППК). В начале гаструляции ППК мигрируют анимально в направлении дна бластоцеля. На стадиях развития гаструлы и нейрулы ППК располагаются глубоко внутри энтодермы. Равномерная сегрегация ПП между дочерними клетками и увеличение количества ППК происходит во время гаструляции. Затем ПП внутри клеток транслоцируется из мембранного положения в околядерное. В итоге образуется от 20 до 50 ППК на зародыш [Kamimura et al., 1980, Verekelya et al., 2007]. К стадии хвостовой почки (стадия 28) все ППК содержат один остров зародышевой плазмы в непосредственной близости от ядра. Морфологически агрегаты ПП также меняют свою форму с момента оплодотворения до стадии хвостовой почки от вытянутых и ветвящихся до круглых гранулярных [Kloc et al., 2001]. Обособившиеся ППК между стадиями 28 и 31 мигрируют к половым валикам [Dzementsei et al., 2013; Kloc et al., 2004a]. Округлая или амебоидная форма ППК и большие межклеточные пространства свидетельствуют об активной миграции клеток (Kamimura et al., 1976). ППК легко отличить от соматических клеток по их большому размеру, огромному ядру, присутствию желточных пластинок и наличию цитоплазматических электронно-плотных гранул, которые часто сопряжены с митохондриями [Wylie, Heasman, 1976]. Предположительно, эти гранулы представляют собой остатки ПП. До 52 стадии ППК остаются в состоянии покоя, а гонады бипотенциальными. Затем начинается дифференцировка гонад. В половых валиках ППК формируют половую линию стволовых клеток, которые дифференцируются либо в ооциты, либо в сперматозоиды.

#### **2.4 Гены-маркеры половой плазмы и первичных половых клеток**

ПП может быть впервые идентифицирована внутри вителлогенного ооцита *Xenopus* в виде электронноплотного материала, обычно расположенного между митохондриями или связанного с эндоплазматическим ретикуломом и ядерной оболочкой со стороны вегетативного полюса [Voronina et al., 2011]. Этот материал

содержит детерминанты развития половых клеток: как РНК, так и белки. РНК включают в себя участвующие в развитии половой линии (*nanos*, *dazl*, *xpat*, *xnif*, *xvelo*, *sybu*, *grip2a*, *ddx25*, *ex2.S*, *germes*, *deadsouth*, *hermes*), некодирующие РНК, а также мРНК, участвующие в формировании оси тела (*trim36*, *dead end homolog 1* (*dnd1*), *plin2*) [Colozza, De Robertis, 2014; Houston et al., 1998; Kloc et al., 2002a; King et al., 2005; MacArthur et al., 1999]. Множество белков ПП является членами piRNA-пути [Schisa, 2012], который защищает целостность генома половой линии, атакуя РНК, генерируемые транспозонами [Arkov, Ramos, 2010; Juliano et al., 2011]. Путем регуляции трансляции материнских мРНК репрессии трансляции соматических мРНК ПП обеспечивает общий контроль трансляции в будущих половых клетках [Lai, King, 2013]. Многие детерминанты называют маркерами ПП или ППК, и их паттерн экспрессии подтверждается с помощью различных методов окраски. Набор маркеров ППК включает в себя консервативные гены *ddx4* (*vasa*), *dazl*, *nanos*, *pum*, *smB/smD*, характерные для животных с обоими типами спецификации половых клеток [Castrillon et al., 2000; Lesch, Page, 2012; Rengaraj et al., 2010; Julaton et al., 2011]. Однако, существуют гены, характерные только для *Xenopus* или животных с детерминационным путем определения половых клеток. Большинство РНК раннего пути локализации в дальнейшем формируют ПП и ППК [Kloc et al., 2001]. Часть белковых компонентов ПП относится к РНК-связывающим белкам (*Xdazl*, *DEADSouth*, *Dead end*, *Hermes*), которые влияют на метаболизм, транспорт и трансляцию РНК в развитии ППК [Houston, King, 2000]. Однако, не все белки, необходимые для спецификации ППК, экспрессируются в оогенезе и являются компонентом ПП. Например, *sox7* и *oct60* (*pou5f3.3*) экспрессируются со стадии зиготы, хотя показано их необходимое участие для нормальной спецификации ППК [Butler et al., 2017].

*Nanos* является первым открытым геном и хорошо изученным компонентом ПП от насекомых до позвоночных. Он является ключевым игроком в поддержании судьбы ППК [Jaruzelska et al., 2003]. Трансляция *Nanos* начинается после оплодотворения и до стадии хвостовой почки в ППК. *Nanos* образует комплекс с *Pumilio*, который взаимодействует с цис-действующими элементами

ЗНТО различных РНК [Cheong, Hall, 2006;], а также репрессирует трансляцию соматических мРНК в ППК [Lai et al., 2012]. Нокдаун Nanos в зародышах *Xenopus* вызывает снижение числа ППК и потерю половых клеток в зрелой гонаде [Lai et al., 2012]. Сходные негативные воздействия на формирование, миграцию и количество ППК оказывает оверэкспрессия или сайленсинг многих генов ПП. Так существенную роль в поддержании ППК оказывают мРНК *dazl* [Houston, King, 2000], DEAD-бок РНК-хеликаза *deadsouth* [Yamaguchi et al., 2013b], XVLG1 (VASA/DDX4) [Ikenishi, Tanaka, 2000], *xpat* [Machado et al., 2005], *grip2a* [Kirilenko et al., 2008] и другие.

мРНК *germes* также является компонентом ПП *X. laevis*. мРНК *germes* экспрессируется исключительно в яичнике, присутствует в превителлогенных ооцитах и локализуется в МО. В зрелом ооците мРНК обнаруживается на вегетативном полюсе в кортексе в составе ПП. В раннем эмбриогенезе она также ассоциирована с ПП. *Germes* кодирует белок, содержащий в своей последовательности два мотива лейциновых молний-застежек и кальций-связывающий EF-hand домен [Berekelya et al., 2007]. Также как и для некоторых генов ПП, оверэкспрессия *germes* вызывает уменьшение количества ППК и негативно влияет на их миграцию. Причем повышенная экспрессия подавляет транслокацию ПП внутри формирующихся ППК на стадии гастрюлы. Вероятно, ингибируется деление ППК в этот момент. Таким образом, *germes* участвует в организации и функционировании ПП в раннем развитии шпорцевой лягушки. Эксперименты Тагучи показали, что ПП внутри ППК транслоцируется из примембранного положения в перинуклеарную область через систему микротрубочек [Taguchi et al., 2012]. Учитывая, что белок *Germes* взаимодействует с легкой цепью динеина 8 (DLC8) [Berekelya et al., 2007], возможно, через моторный комплекс динеина *Germes* участвует в транслокации ПП по микротрубочкам.

## 2.5 Локализация детерминантов в оогенезе – ключ полярности и будущего паттерна развития

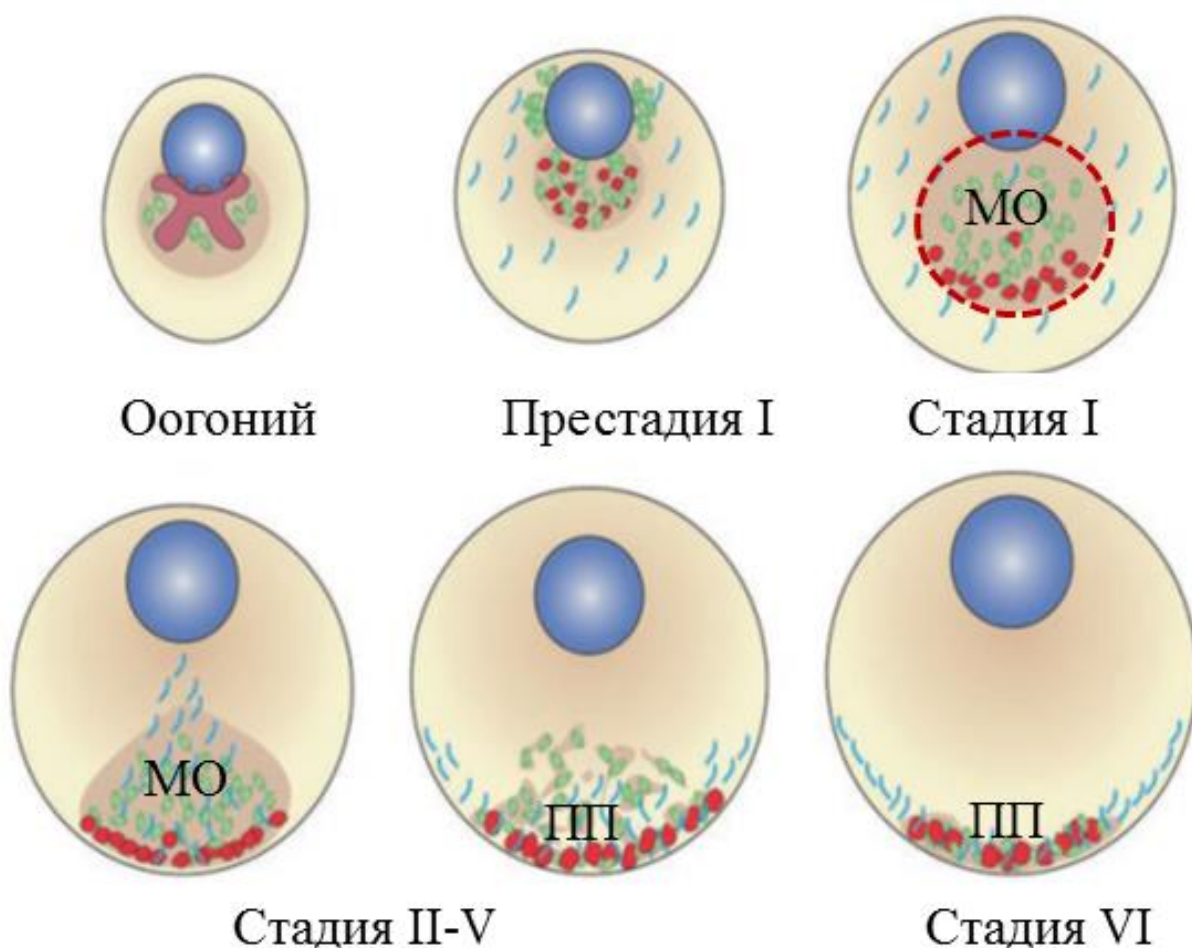
Локализованное расположение различных молекул РНК описано для широкого спектра типов клеток. Асимметричная локализация в клетке описана как для кодирующих, так и для некодирующих РНК. Будучи практически универсальным явлением в клетках эукариот, локализованное расположение РНК в ооцитах, наиболее известно как фактор, регулирующий паттерны развития позвоночных и беспозвоночных животных [Houston, 2013]. Неравномерное распределение и локализация РНК в разных компартментах ооцита является значимым фактором, определяющим полярность яйца. К наиболее активно исследуемым объектам, у которых изучают РНК-детерминанты полярности ооцитов, относятся *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* и *Xenopus laevis* [Oh, Houston, 2017a; Micklem, 1995; Seervai, Wessel, 2015]. В данной работе внимание сконцентрировано на представителе бесхвостых амфибий – шпорцевой лягушке *Xenopus laevis*.

Длительный процесс оогенеза начинается с этапа митотических делений стволовых клеток зародышевой линии, в результате которых образуется популяция оогониальных клеток. Во время митотических делений оогонии подвергаются неполному цитокинезу, в результате чего оогониальные клетки остаются соединенными цитоплазматическими мостиками со своими сестринскими клетками, таким образом образуя цисту [Kloc et al., 2004a; Konduktorova, Luchinskaya, 2013]. Между сестринскими клетками цисты происходит взаимообмен цитоплазмой или специфическими регуляторными факторами, что обеспечивает их синхронное развитие. После определенного количества делений оогонии входят в мейоз, и к стадии пахитены цитоплазматические мостики между клетками разрываются. После этого каждый ооцит уже начинает свой индивидуальный путь фолликулогенеза.

На рыбке данио показано, что процесс локализации РНК начинается еще в оогониях и ассоциирован с митохондриальным облаком (МО или тело Бальбиани)

[Heim et al., 2014; Elkouby et al., 2016]. Перед вступлением оогониев в мейоз I предшественники митохондриального облака радиально распределены в цитоплазме, теломеры рассеяны внутри ядра, а centrosoma находится в околоядерном положении, и возможно, обращена к цитоплазматическому мостику последнего митотического деления. К моменту начала мейоза I предшественники МО локализуются вокруг centrosomy и рядом с букетом теломер. Ассоциация centrosom и теломер отмечает будущий вегетативный полюс ооцита. Таким образом, местоположение букета хромосом предопределяет анимально-вегетативную ось яйцеклетки [Elkouby et al., 2016].

У лягушки скопления митохондрий также наблюдались в оогониях вблизи цитоплазматических мостиков [Kloc et al., 2004a]. Однако, связано ли данное место агрегации митохондрий с расположением зрелого МО, пока не ясно. На I-II стадиях оогенеза МО первоначально расположено непосредственно рядом с ядром со стороны вегетативного полюса. Структура МО связана с митохондриями и эндоплазматическим ретикулумом (ЭПР). На III стадии оно расширяется, достигает вегетативного полюса, и в конечном итоге рассеивается, оставляя после себя область, сильно обогащенную митохондриями [Chang et al., 2004]. Во время «роста» в направлении к вегетативному полюсу МО захватывает мРНК и белки. На вегетативном полюсе МО распадается на небольшие островки, которые закрепляются в кортексе, включая в свой состав рибонуклеопротеиновые (РНП) комплексы. МО, а затем и ПП, содержит материнские детерминанты: кодирующие и не кодирующие РНК, белки в составе электронноплотных гранул (или нуаж) [Kloc et al., 2004b]. У шпорцевой лягушки эти гранулы носят название половых. Они необходимы для формирования половых клеток [Houston, King, 2000b].



**Рисунок 3.** Формирование половой плазмы и локализация РНК во время оогенеза у *Xenopus* [Aguero et al., 2017]. Синим цветом изображены РНК, зеленым – митохондрии, красным – половые гранулы.

Заложенная в мейозе анимально-вегетативная полярность яйца в будущем определяет точку вхождения сперматозоида, оси эмбриона и лежит в основе механизма спецификации половых клеток. РНК шпорцевой лягушки во время оогенеза преимущественно локализуются либо на анимальном, либо на вегетативном полюсе ооцита. Группа исследователей провела транскриптомный и протеомный анализ анимально-вегетативных частей оси ооцитов *X. laevis* и разделила 98% ооцитарных мРНК на четыре группы по профилю локализации: анимальному, вегетативному, крайне вегетативному и крайне анимальному [Sindelka et al., 2018]. Крайне вегетативно и анимально локализованные мРНК располагаются в кортексе ооцита. Анимально локализованные РНК кодируют факторы, которые могут участвовать в спецификации эктодермы. Возможно, они



также играют роль в формировании центра Ньюкупа на дорсальной стороне вместе с вегетативно-локализованными РНК [Schnapp et al., 1997]. К локализующимся в анимальном полушарии яйца *Xenopus* относятся такие РНК, как *anl-4* [Rebagliati et al., 1985; Hudson et al., 1996], *xlan4* [Reddy et al., 1992], *xl21* [Kloc et al., 1991], *oct-60* [Hinkley et al., 1992], *pabpc4* (PABP) [Schroeder, Yost, 1996], *tubb* ( $\beta$ -тубулин) [Yisraeli et al., 1990], *nup93* [ранее *an4a*, *phax* [Snedden et al, 2013], *lima1*, *dand5*, and *ifrd2* [Sindelka et al., 2018]. О механизме транслокации и связывания РНК на анимальном полюсе известно меньше, чем на вегетативно. Показано наличие определенных мотивов в 3'НТО последовательности мРНК для локализации на анимальный полюс [Sindelka et al., 2018]. Локализация анимально чаще наблюдается с IV стадии оогенеза *X. laevis*. Хотя детально описана анимальная локализация всего нескольких транскриптов, недавние исследования показали, что на самом деле существуют сотни локализованных анимально транскриптов [Owens et al., 2017; Sindelka et al., 2018]. Кроме того, многие из этих транскриптов демонстрируют высокий уровень консервативности среди различных видов (*D. rerio*, *A. ruthenus*, *X. laevis* и *A. mexicanum*) [Naraine et al., 2022]. Концентрирование материнских РНК на анимальном полушарии ооцита предполагает наличие либо транспорта, либо связывания с определенными белками и изменения растворимости таких комплексов. В исследовании Шнеддена было показано, что РНК, транспортируемые как в анимальное, так и в вегетативное полушарие, взаимодействуют с одинаковым набором из шести белков. Это указывает на существование общей транспортной группы белков, которая связывается с локализованными РНК, независимо от места конечного назначения [Snedden et al, 2013]. Однако, детали этих транспортных механизмов все еще плохо изучены.

РНК, локализующиеся в противоположном вегетативном полушарии, связываются со структурами в кортикальном слое вегетативного полюса ооцита [King et al., 2005]. Вегетативный полюс яйца играет важнейшую роль в раннем эмбриональном развитии *Xenopus*, а также в детерминации первичных половых клеток [Houston, 2013]. Сигналы соматических детерминант вегетативного

полюса яйца лежат в основе ключевых индукционных событий – индукции мезодермы в экваториальной области (Ньюкуповская индукция), а позже инициируют экспрессию дорсальных детерминант в организаторе Шпемана. Иными словами, гены, экспрессирующиеся в этом районе зародыша, вызывают образование дорсальных структур, а также запускают комплексные программы развития эмбриона. Таким образом многие из локализованных на вегетативном полюсе мРНК являются соматическими детерминантами и играют важную роль в установлении осевой организации эмбриона. А ППК *Xenopus* закладываются в результате наследования половой плазмы, часть РНК которой играют роль в формировании половой линии [Houston, King 2000; Kloc et al. 2002b]. РНК половой плазмы начинают экспрессироваться очень рано в оогенезе, участвуют в регуляции первых этапов оогенеза, а позже регулируют миграцию и деление ППК.

В недавних исследованиях выделили новый класс цитоплазматических РНП частиц, расположенных на вегетативном полюсе, которые назвали Л-тельца (L-bodies – localization-bodies, тельца локализации). Л-тельца в своем составе содержат специфические вегетативно локализованные мРНК и взаимодействующие с ними белковые факторы [Neil et al., 2021]. Исследователи определили, что в их состав входят мРНК генов, играющих важную роль в разметке эмбриона (такие как *vg1*). Хотя по данным авторов Л-тельца содержат белки, которые встречаются и в других типах цитоплазматических РНП гранул, они утверждают, что Л-тельца отличаются от стрессовых гранул, Р-телец и зародышевых гранул и пр. по наличию уникальных белков в составе (~ 27%). Внутри Л-телец концентрация РНК достаточно высока, что позволяет им эффективно взаимодействовать как с белками, так и с другими РНК. Известно, что динамика состояния РНП-частиц непостоянна и может меняться в контексте физиологического состояния конкретного ооцита, поскольку тельца могут служить неким пулом для хранения мРНК [Tauber et al., 2020]. Не исключено, что РНК неким образом проходят отбор, чтобы войти в состав телец, например, благодаря своим физическим и термодинамическим свойствам.

На основании механизма локализации на вегетативный полюс мРНК долгое время подразделялись на две подгруппы: использующие ранний путь локализации (или METRO) с участием МО [Forristall et al., 1995; Kloc and Etkin, 1995; Kloc et al. 1996], и поздний путь, уже после распада МО [Kloc et al., 2001; Rand, Yisraeli 2001]. РНК, локализованные по раннему пути, включают мРНК, кодирующие компоненты половой плазмы и сигнальные молекулы, такие как мРНК *xdazl* и *xwnt11*, а также семейство некодирующих РНК, называемых *Xlsirts* [Forristall et al., 1995; Heasman et al., 1984; Houston et al., 2000a; Kloc et al., 2005; Mosquera et al., 1993; Zearfoss et al., 2003]. Ранний механизм, при котором РНК захватываются МО, функционирует на ранних стадиях оогенеза I и II (Рис.3). Ранний тип локализации характерен для РНК: *xCat-2*, *xpat*, *xdazl*, *germes*, *DEADSouth*, *xlsirts*, *vasa*, *syntabulin*, *grip2* и др. [Houston, 2013; King et al., 2005, Tarbashevich et al., 2007, Colozza, De Robertis, 2014, Berekelya et al., 2003; Yamaguchi et al., 2013b; MacArthur et al., 1999]. МО является универсальной консервативной структурой, обнаруженной в ооцитах насекомых, лягушек, рыб, птиц, приматов и др. [Cox, Spradling, 2003; Marlow, Mullins, 2008; Dumont, 1978; Carlson et al., 1996; Barton, Hertig, 1972]. Митохондриальное облако, прежде всего, является источником материала для половой плазмы, которая является детерминантой ППК, поэтому многие РНК, которые используют этот механизм локализации, впоследствии включаются в состав половой плазмы. Другие РНК (*wnt8*, *trim36*, *grip2a* и *sybu*), использующие ранний путь, кодируют дорсальные детерминанты и механизмы их локализации. В состав МО также входят РНК-связывающие белки (Hermes) и рибонуклеопротеиновые скаффолд-белки (GasZ).

Альтернативный путь локализации таких РНК, как *vegT*, *vg1*, *xbic-c* и *xvelo1* проходит на стадиях оогенеза III и IV, когда уже начался вителлогенез, поэтому называется поздним [Weeks, Melton, 1987; Kloc, Etkin, 1995; Kloc et al., 2001]. Чаще РНК позднего механизма локализации играют важную роль в формировании энтодермы и индукции мезодермы. Локализацию обеспечивают определенные короткие последовательности в 3'НТО [Ponomarev et al., 2021]. Они, в свою очередь, связываются с транс-действующими белковыми факторами,

взаимодействующими с динеином или кинезином. Таким образом, поздно локализующиеся РНК используют механизм, зависящий от компонентов цитоскелетной сети, включающий транспорт по микротрубочкам [Yisraeli et al., 1990; Betley et al., 2004; Yoon, Mowry, 2004; King et al., 2005]. Организация цитоскелета на вегетативном полюсе зависит также от локализации некодирующих РНК *xlsirt*, поскольку снижение количества этих транскриптов приводит к нарушению цитокератиновой сети, что свидетельствует о важности локализации этих некодирующих РНК [Kloc et al., 2005].

Описаны РНК (*fatVg* и *xNif*), которые используют оба пути локализации на вегетативный полюс, поэтому можно выделить и смешанный путь [Chan et al., 1999, 2001; Kloc et al., 2001; Houston, 2013]. Так, у РНК *xNif* было показано, что в его 5'НТО расположена область, благодаря которой РНК может захватываться как митохондриальным облаком, так и транспортироваться на вегетативный полюс на более поздних стадиях [Claussen et al., 2004]. Некоторые РНК половой плазмы *xcat2*, *xpat*, *xlsirt*, *germes*, использующие ранний путь, могут локализоваться в островки по механизму позднего пути [Zhou, King, 1996; Hudson, Woodland, 1998; Verekeya et al., 2003]. Однако не ясно, представляют ли они отдельный путь локализации, или эти РНК последовательно используют установленные ранний и поздний пути.

В литературе описываются три основных механизма асимметричной локализации РНК: диффузия и захват, локальная стабилизация и регулируемая деградация, а также активный транспорт с помощью молекулярных моторов. По первому механизму локализуются РНК, прежде диффузно распределенные по цитоплазме [Kloc et al., 2004b]. Сюда можно отнести РНК, которые захватываются и аккумулируются МО. Относительно недавно установлено, что МО является биомолекулярным конденсатом [Voke et al., 2016]. Таким образом, РНК раннего пути локализуются в конденсированные структуры. Способ захвата диффузных РНК в фазово-разделенную структуру может быть ключевым механизмом для аккумуляции равномерно распределенных РНК. Третий механизм локализации наиболее распространен и чаще описан в литературе. Активный транспорт с

использованием цитоскелета позволяет быстро и на более длительные расстояния направить РНК. К данному типу относится поздний тип локализации РНК на вегетативный полюс [Gagnon et al., 2013; Messitt et al., 2008]. Пространственная организация цитоплазмы достигается также за счет образования биомолекулярных конденсатов – клеточных компартментов, которые формируются в результате разделения фаз и выполняют функцию концентрации белков и нуклеиновых кислот без использования мембраны. Принципы разделения фаз впервые были описаны в ооцитах, а затем обнаружены у многих видов [Brangwynne et al., 2009].

В ооцитах *Xenopus*, как и во всех других клетках, РНК не локализуются самостоятельно, а связываются с белками, образуя рибонуклеопротеиновые комплексы (РНП). Образование РНП комплекса необходимо для локализации, трансляционного сайленсинга и стабильности РНК. Связывание происходит cis-действующими последовательностями РНК, называемыми zip-кодами или элементами локализации [Kislauskis, Singer, 1992]. Cis-последовательности могут связывать белки на основе их первичной нуклеотидной последовательности, вторичной структуры или того и другого. Чаще всего cis-элементы встречаются в 3'НТО мРНК [Mowry, Melton, 1992; Gavis et al., 1996; Deshler et al., 1998; Chan et al., 1999]. Cis-последовательности впоследствии связываются с транс-действующими белками для формирования РНП. Поиск cis-действующих мотивов, необходимых для правильной локализации, привел к определенным минимальным последовательностям, достаточным для локализации. Однако, обнаруженные элементы локализации были не похожи друг на друга по первичной последовательности или вторичной структуре, а также сильно различались по длине. Так были выявлены cis-элементы длиной от десятков нуклеотидов до 1 кб [Jambhekar, Derisi, 2007]. Были обнаружены короткие мотивы, участвующие в локализации многих РНК. Возможно, эти cis-мотивы конкурируют за связывание с одними и теми же транс-действующими белками [Houston, 2013]. В свою очередь, многие транс-факторы содержат несколько РНК-связывающих доменов и поэтому способны взаимодействовать либо с одной

молекулой РНК в нескольких местах, либо с несколькими молекулами РНК одновременно [Cote et al., 1999; Deshler et al., 1997]. Такая многовалентность взаимодействий важна для формирования РНП и последующей локализации РНК.

## **2.6 Щелевые контакты ооцита и фолликулярных клеток – основа межклеточной коммуникации**

Ультраструктурный анализ яичника *Xenopus* показал, что макровилли фолликулярных клеток, проникающие сквозь желточную оболочку, взаимодействуют с микровиллиями ооцита, образуя особые контакты (рис. 1) [Dumont, Brummett, 1978]. Они были идентифицированы как щелевые контакты [Browne, Werner, 1984]. Щелевые контакты были выявлены также в яичнике млекопитающих между клетками гранулезы и ооцитами [Albertini, Anderson, 1974]. Связь между ФК и ооцитом необходима как для роста, вителлогенеза, поддержания мейотического блока и дальнейшего созревания ооцита, так и для развития фолликула в целом. Щелевые контакты соединяют цитоплазматический компартмент соседних клеток, обеспечивая межклеточную или паракринную коммуникацию и быстрый обмен ионами и метаболитами, включая вторые мессенджеры, такие как  $Ca^{2+}$ , инозитолфосфаты или циклические нуклеотиды [Goldberg et al., 2004].

Каждый щелевой контакт сформирован каналом. Канал образуется в результате состыковки двух полуканалов или коннексонов. Они располагаются вокруг водной поры таким образом, что коннексон в плазматической мембране одной клетки обращен к коннексону в мембране другой клетки [Sosinsky, Nicholson, 2005]. Каждый коннексон состоит из шести белков коннексинов.

Всего на сегодняшний момент у шпорцевой лягушки обнаружено 19 коннексинов. [Gimlich et al., 1990; Yoshizaki, Patiño, 1995; Landesman et al., 2003, De Boer et al., 2005a; De Boer et al., 2007]. Многие коннексины *Xenopus* являются ортологами у млекопитающих [Landesman et al., 2003; De Boer et al., 2005a]. Cx38 является уникальным коннексином *Xenopus*, не имея сходства больше 38% ни с одним из коннексинов мыши и *Danio*.

В оогенезе методами RT-PCR или *in situ* гибридизацией обнаружена мРНК пяти коннексинов: - Cx31, Cx38, Cx41, Cx43 и Cx43.4 [Gimlich et al., 1990; Yoshizaki, Patiño, 1995; Landesman et al., 2003]. Исследователи подметили, что только мРНК Cx38 была транслирована до оплодотворения, в то время как другие материнские РНК коннексинов подвергаются трансляционной регуляции во время оогенеза и раннего развития [Richter, Smith, 1984; Taylor et al., 1985]. Транскрипты Cx38 и Cx43.4 экспрессируются в ооцитах на высоком уровне и образуют активные каналы, причем количество мРНК распределено одинаково вдоль анимально-вегетативной оси [Landesman et al., 2003].

В ФК не экспрессируется мРНК Cx38 [Bruzzone et al., 1995], а в ооцитах уровень его экспрессии выше, чем других. Вероятнее всего, щелевые контакты между ооцитом и ФК могут быть образованы гетеротипическими каналами Cx38-Cx43. Гетеротипические каналы, содержащие Cx38 и Cx43, демонстрируют гораздо более высокий уровень активности, чем Cx38 гомотипические [Swenson et al., 1989]. У *Xenopus* ортологом Cx37 млекопитающих, формирующего контакты ооцит-гранулеза, является Cx41, экспрессия которого в ооцитах отсутствует [Yoshizaki, Patiño, 1995]. В соматических клетках яичника (ФК и тека) также был обнаружен Cx43. Вопрос, какими коннексинами сформированы контакты между ФК, остается не исследованным.

Ионы и цитоплазматические молекулы могут диффундировать между клетками через щелевые контакты. При этом существует множество типов каналов с ~20 функционально различными изоформами коннексина. Они могут объединяться в гомомерные и гетеромерные канальные структуры, что влияет на свойства их проницаемости и проводимости. Поры коннексиновых каналов могут быть избирательно настроены на транспорт специфических цитоплазматических молекул, и, экспрессированные в определенных клетках, опосредуют высокоспецифическую межклеточную сигнализацию [Harris, 2007]. Проницаемость также зависит от поверхностного заряда поры, электростатических взаимодействий между порами, степени открытости канала, фосфорилирования, связывания с белками. Через щелевые контакты из ооцита в

фолликулярные клетки шпорцевой лягушки способны проходить большие белковые молекулы кальмодулина и тропонина размером 17 кДа и 18 кДа, соответственно [Curran, Woodruff, 2007; Cieniewicz, Woodruff, 2010]. Авторы высказывают предположение, что этому способствует фибриллярная трехмерная структура этих белков, поскольку остеокальцин размером всего 6 кДа, но V-образной формы, не проходил через щелевые контакты. Транспорт в противоположном направлении из ФК в ооцит до настоящего времени не показан ввиду методических трудностей.

Два десятилетия назад Панчин с соавторами открыли семейство паннексинов у человека и мыши, которое представляет собой группу из трех ген-кодирующих белков Pannexin 1, Pannexin 2 and Pannexin 3 [Panchin et al., 2000]. Паннексины имеют топологию, подобную коннекسينам. Доказательство функции паннексинов крысы в образовании межклеточных каналов позвоночных было показано на ооцитах *Xenopus* [Bruzzone et al., 2003]. PANX1 отдельно и в комбинации с PANX2, индуцирует образование контактов. У *Xenopus* обнаружены только два паннексина PANX1 и PANX2. [Panchin, 2005]. PANX1 был найден среди EST клонов, полученных из ооцитов [de Boer, van der Heyden, 2005b]. Участие паннексинов в развитии и созревании ооцитов у шпорцевой лягушки пока не описано. На млекопитающих показано, что Pannexin 1 участвует в развитии и росте ооцитов [Dye et al., 2020]. Причем, Pannexin 1 локализован и в ооцитах, и в соматических клетках фолликула, а экспрессия гена в кумулюсных клетках повсеместна.

## **2.7 Вклад фолликулярных клеток в процесс вителлогенеза**

Процесс аккумуляции желтка ооцитом называется вителлогенезом. Молекулы белков в составе желтка являются основным источником незаменимых аминокислот во время всего периода раннего онтогенеза, а также обеспечивают зародыш многими дополнительными питательными веществами, включая фосфолипиды, холестерин и фосфаты. Желток хранится в плотных мембраносвязанных органеллах, называемых желточными гранулами. Эти



органеллы, по-видимому, обладают высоким уровнем консервативности, поскольку желточные гранулы животных различных филогенетических групп формируются по практически одинаковому механизму и содержат гомологичные белки [Grant, Hirsh, 1999; Opresko et al., 1980].

Хотя у некоторых животных ооцит способен синтезировать все необходимые вещества самостоятельно, у подавляющего большинства групп животных синтез желтка вынесен за пределы гонады. В ооцитах амфибий накапливается довольно большое количество желтка. Поскольку размер развивающихся ооцитов напрямую коррелирует с количеством запасаемого желтка, то зрелые ооциты амфибий сравнительно крупные.

У *X. laevis* желточные гранулы занимают около половины объема яйца, однако производные вителлогенина составляют ~90% (по массе) белка яйца. Такая плотность производных вителлогенина возможна благодаря тому, что эти белки хранятся в кристаллическом виде. Производных вителлогенина достаточно для питания эмбриона в течение длительного периода развития вследствие того, что вителлогенин обладает высокой питательной ценностью. Он состоит из ~1800 ак, часть из которых незаменимы. Вителлогенин (ВГ) также взаимодействует с ~50 молекулами липидов, ~95 молекулами ковалентно связанного фосфата, а также примерно одним ионом цинка, двумя кальция, тремя магния, 0,5 железа и многочисленными ионами натрия и калия [Montorzi et al., 1995; Ohlendorf et al., 1977; Thompson, Banaszak, 2002; Wiley, Wallace, 1981].

У *Xenopus laevis* предшественник желтка - вителлогенин синтезируется в печени самки, высвобождается в кровотока, акцептируется ооцитами [Wallace, Dumont, 1968; Wallace et al., 1973; Varriale, 1988] и депонируется в желточных гранулах [Yoshizaki, 1992]. ВГ может существовать в трех изоформах с молекулярной массой около 200 кДа [Wiley, Wallace, 1978]. У *Xenopus* кодируется четырьмя генами (A1, A2, B1, B2) с высокой гомологией [Wiley, Wallace, 1981; Wahli et al., 1982; Wallace et al., 1990; Yoshitome et al., 2003]. ВГ расщепляется катепсином Д и преобразуется в липопроотеины с фосвитином [Yoshizaki, Yonezawa, 1994]. Липопроотеины состоят из липовителлина 1 (111-121 кДа) и

липовителлина 2 (30,5-34 кДа), оба которых имеют три изоформы, а фосвитин включает в себя комплекс из фосвитин 1 (19 кДа) и фосвитин 2 (13-14 кДа) [Willey, Wallace, 1981].

Чтобы попасть в ооцит, ВГ должен последовательно преодолеть несколько барьеров: эндотелий сосудов, соединительнотканную теку, базальную мембрану, фолликулярные клетки и, наконец, желточную оболочку. Полагают, что путь вителлогенина через перечисленные преграды к поверхности ооцита осуществляется по межклеточным пространствам, порам и каналам, а затем посредством рецептор-опосредованного пиноцитоза и эндоцитоза ВГ поглощается ооцитом [Dumont, 1978; Opresko, Wiley, 1987; Wallace, Selman, 1990; Stifani et al., 1990]. Рецептор к ВГ был выделен из ооцитов *Xenopus* [Stifani et al., 1990]. Это белок с массой 115 кДа. Внутри ооцита вителлогенины протеолитически расщепляются в эндосомах на липовителлины с высокой и низкой молекулярной массой (LvH и LvL), фосвитины (Pv) и фактор Виллебранда типа Д (vWFD), формируя первичные желточные гранулы [Opresko et al., 1980; Buschiazzo et al., 2003; Finn, 2007].

Ранее считалось, что накопление вителлогенина в ооцитах начинается в конце стадии II – начале стадии III (диаметр ооцита 0,45мм), когда становятся видны первые желточные гранулы. Однако накопление желточных белков начинается раньше, на стадиях, которые считались превителлогенными [O'Brien et al., 2010].

Весь процесс вителлогенеза находится под мультигормональным контролем и связан с сезонностью. В норме ВГ синтезируется только репродуктивно зрелыми самками. В ответ на выделяемые гипофизом гонадотропины фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны (ФСГ и ЛГ) в фолликулах начинают синтезироваться эстрадиол-17 $\beta$  [Redshaw, 1972; Parkoff et al., 1976; Polzonetti-Magni et al., 1998]. Эстрадиол-17 $\beta$  стимулирует синтез ВГ клетками печени, а также, возможно, отвечает за его интернализацию растущими ооцитами. Также показано положительное влияние гормона роста и пролактина на синтез и высвобождение ВГ [Polzonetti-Magni et al., 1995]. У лягушки

способность печени реагировать на стимуляцию эстрогенами запрограммирована в процессе развития; печень головастика на ранней стадии метаморфоза не может синтезировать ВГ, и их нельзя индуцировать к этому ни *in vivo*, ни в культуре *in vitro* [Wangh, Knowland, 1975]. Максимальной способностью к синтезу эстрадиола-17 $\beta$  обладают вителлогенные фолликулы [Fortune, 1983]. При развитии фолликула от стадии IV к стадии VI продукция эстрадиола-17 $\beta$  снижается в 10-30 раз. При этом синтез гормона в изолированных фолликулярных оболочках ооцитов этих же стадий снижается только в 4 раза. Таким образом, ведущая роль в синтезе эстрадиола-17 $\beta$  и стимуляции выработки ВГ принадлежит самому ооциту [Sretarugsa, Wallace, 1997].

Поскольку яичник амфибий одновременно содержит ооциты разных стадий развития, т.е. в одном и том же гормональном окружении захват и накопление желтка осуществляется только ограниченной популяцией ооцитов, то можно предположить, что сигнал, регулирующий вителлогенез, должен иметь локальный характер. Монако с соавторами показал, что разобщение щелевых контактов с помощью октанола у *Xenopus* приводит к торможению процесса вителлогенеза [Monaco, 2007]. Установлено, что цАМФ является молекулой, запускающей поглощение вителлогенина ооцитами. Она поступает из ФК через щелевые контакты. В ооците цАМФ может связываться с белком Херас и инициировать сигнальный путь IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>, которые запускают процесс поступления вителлогенина [Serrano et al., 2013]. Нарушение связности клеток октанолом или ингибитором кальмодулина, регулирующим проницаемость щелевых контактов, приводит к остановке вителлогенеза [Luque et al., 2011]. Добавление в среду дбцАМФ полностью восстанавливает процесс интернализации ВГ. Таким образом, ФК являются ключевым регулятором вителлогенеза.

Уоллису и Мисуловину удалось вырастить ооциты *X. laevis in vitro* в среде с добавлением вителлогенина [Wallace, 1978]. Эти ооциты, лишённые фолликулярных клеток, продолжали линейно увеличиваться в объеме сверх нормального размера. Что еще более примечательно, ооциты яичников, которые уже были полностью выращены *in vivo*, возобновили рост при помещении в

данные условия. Таким образом, фолликулярные клетки определяют не только степень зрелости, но и размер созревающих ооцитов, вовремя ограничивая неконтролируемый рост.

Во время оогенеза сам ооцит также синтезирует белки, жиры и углеводы. Полагают, что липиды начинают синтезироваться ооцитом еще на превителлогенной стадии. Уже на II стадии наблюдается скопление мелких липидных везикул вокруг ядра. Полисахариды запасаются ооцитом в виде гликогена и нейтральных мукополисахаридов в поверхностном слое желточных гранул [Albanese-Carmignani, Zaccone, 1977]. Синтез гликогена в ооцитах может осуществляться как прямым путем через уридиндифосфат-глюкозу, так и непрямым путем через молочную кислоту [Kessi et al., 1996; Preller et al., 2007].

По оценке Опреско и Вили, 80-90% тотального белка зрелых ооцитов происходит из вителлогенина, получаемого с кровотоком, а прочие 10-20% белка синтезируются ооцитом [Opresko, Wiley, 1987]. В состав липидной фракции желтка существенный вклад вносят фолликулярные клетки [Uribe, 2003]. У закончивших рост ооцитов *Bufo arenarum* липидная фракция содержит главным образом фосфолипиды (фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин), ненасыщенные фосфолипиды, триацилглицеролы, полярные и нейтральные липиды [Buschiazzo et al., 2003; Buschiazzo, Alonso, 2005]. Суммарное количество липидов увеличивается вдвое к стадии IV по сравнению со стадией III [Bruzzzone et al., 2003].

В желточных гранулах созревающих ооцитов с помощью иммуногистохимических методов показано наличие активинов [Uchiyama et al., 1994]. За связывание активина в желточных гранулах отвечает фоллистатин [Fukui et al., 1999]. Активины являются факторами роста и дифференцировки и принадлежат суперсемейству TGF- $\beta$ . Они вовлечены в регуляцию многих физиологических процессов, в том числе в развитие и созревание половых клеток [Li et al., 1994]. Впервые активины были очищены из фолликулярной жидкости млекопитающих как белки с массой 25 кДа, способные стимулировать секрецию ФСГ [Ying, 1988]. В результате гомо- и гетеро-димеризации двух  $\beta$ -субъединиц,

$\beta$ A и  $\beta$ B образуются три различные формы: активин-А, состоящий из  $\beta$ A $\beta$ A; активин-В, состоящий из  $\beta$ B $\beta$ B; и активин-АВ, состоящий из  $\beta$ A $\beta$ B. Все три формы этих белков были выделены и очищены из клеточной линии *Xenopus* [Fukui et al., 1993, 1994]. В *Xenopus* транскрипты  $\beta$ A и  $\beta$ B присутствуют в ФК, но не в ооцитах [Thomsen et al., 1990; Rebagliati, Dawid 1993]. Поэтому считается, что ФК созревающих фолликулов секретируют активин, который затем поглощается ооцитами.

## 2.8 Роль фолликулярных клеток в стероидогенезе

ФК вырабатывают важные модуляторы, такие как серотонин, дофамин и норадреналин, гонадотропины (фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ) и гормон роста), простагландины и нейропептиды (окситоцин, предсердный натрийуретический пептид, кортикотропин-рилизинг фактор, гонадотропин-рилизинг гормон, кальцитонин-ген-связанный пептид) и экспрессируют ионные каналы [Miledi et al. 1989].

Клетки фолликулярной оболочки играют ключевую роль в стероидогенезе, что влияет на рост и созревание ооцита. Как уже было сказано ранее, все ооциты, которые растут в яичниках *X. laevis*, находятся в профазе первого мейотического деления независимо от их стадии развития [Ken-ichi Sato, Tokmakov, 2020]. На данном этапе ооциты неспособны к оплодотворению и называются незрелыми. Незрелые ооциты приобретают способность к оплодотворению в процессе мейотического созревания, когда полностью выращенные ооциты стадии VI выходят из мейотического ареста, проходят первое деление мейоза и снова останавливаются на метафазе второго мейотического деления.

В период размножения секреция гонадотропных гормонов гипофиза значительно повышается. Например, созревание и овуляция ооцитов *Rana pipiens* и *Rana dybowskii in vitro* в овариальных фрагментах и изолированных фолликулах, обработанных гипофизарными препаратами, значительно варьирует, проявляя сезонную зависимость [Smith et al., 1968]. Гонадотропины вырабатываются в ответ на повышение концентрации гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ).

Таким образом, ГнРГ стимулирует и контролирует рост фолликулов. Клетки теки имеют рецепторы, связывающие лютеинизирующий гормон (ЛГ), а под влиянием ЛГ они вырабатывают андрогены [Kwon, Ahn, 1994; Ahn et al., 1999]. Основная роль ЛГ заключается в содействии созреванию фолликулов и ооцитов. [Senger, 2012]. ЛГ также отвечает за овуляцию яйцеклетки. Связывание ЛГ с клетками теки приводит к превращению холестерина в тестостерон. Тестостерон затем диффундирует в фолликулярные клетки. ФК также содержат рецепторы, которые связывают ФСГ. ФСГ отвечает за стимуляцию роста фолликулов. Когда ФСГ связывается с ФК, то активируется процесс преобразования тестостерона в эстрадиол [Senger 2012].

Рецепторы к ФСГ и ЛГ (ФСГР и ЛГР) у амфибий клонированы, но исследованы довольно плохо. Первые опубликованные данные о клонировании рецептора к ФСГ были выполнены на тритоне *Synops pyrrogaster* [Nakayama et al., 2000] и частично к ЛГ на *X. laevis* [Yang et al., 2007]. Показано, что экспрессия ФСГР резко возрастает у *X. laevis*, в отличие от ЛГР, еще до созревания гонад на стадиях метаморфоза, что предполагает роль ФСГР во время гаметогенеза. Это согласуется с данными на рыбах [Kwok et al., 2005]. При развитии фолликулов у данио экспрессия мРНК ФСГР повышается во время всего оогенеза, в то время как ЛГР достигает пика только на последних стадиях созревания ооцитов. Также на рыбах установили, что ФСГР и ЛГР являются рецепторами, сопряженными с гетеротримерными ГТФ-связывающими белками [Ascoli et al., 2002; Smits et al., 2003]. ФСГР обнаружены на фолликулярных клетках и клетках теки, тогда как рецепторы к ЛГ обнаружены в ФК, но не в ооците. Рецепторы к гонадотропным гормонам в ооцитах не обнаружены [Miwa et al., 1994]. По-видимому, это верно и для амфибий, поскольку исследования показывают, что ЛГ стимулирует созревание фолликулов, но не «раздетых» ооцитов. ФСГР с одинаковой эффективностью связывает как ФСГ, так и ЛГ, тогда как ЛГР связывается только с ЛГ и обладает высокой видоспецифичностью [Oba et al., 1999 a, b].

Под действием ФСГ и ЛГ ФК продуцируют прогестерон (Пг) [Sretarugsa, Wallace, 1997]. Предполагается, что у *X. laevis* Пг является основным

физиологическим эффектором, который способствует созреванию ооцитов [Ferrell, 1999]. Пг действует через 2 типа сигнализации: геномную (классическая сигнализация) через ядерные рецепторы, которые модулируют транскрипцию генов, и/или быструю негеномную (неклассическая сигнализация) через мембранные прогестероновые рецепторы [Dressing et al., 2011; Moussatche et al., 2012]. Мембранный рецептор к Пг был впервые клонирован из яичников рыб и принадлежит к семейству рецепторов прогестерона и адипонектина [Zhu et al., 2003]. Созревание ооцитов *Xenopus* представляет собой один из старейших и подробно изучаемых негеномных физиологических реакций. Ответ на снятие мейотического ареста происходит в основном через мембранный рецептор [Ben-Yehoshua et al., 2007]. Причем Пг опосредует интернализацию мембранного рецептора через клатрин-зависимый путь эндоцитоза [Nader et al., 2020]. У *Xenopus* идентифицированы 2 формы классического рецептора к прогестерону ПгP1 и ПгP2, транскрибируемые с одного гена [Baaya et al., 2000, Tian et al., 2000; Liu et al., 2005]. В ооците экспрессируются обе формы рецептора, хотя уровень мРНК и белка ПгP1 в ооците низкий [Martinez et al., 2006]. В ФК обнаружен только ПгP1 [Liu et al., 2005]. Оверэкспрессия ПгP1 в ооцитах значительно ускоряет созревание, индуцированное прогестероном, а инъекция антисмыслового олигонуклеотида против ПгP1 практически полностью его блокирует [Tian et al., 2000]. При индукции созревания прогестероном ПгP1 в ФК деградирует по убиквитиновому пути, тогда как ПгP2 в ооците фосфорилируется [Liu et al., 2005]. У позвоночных обнаружено большое семейство рецепторов к Пг (13 или более), относящихся к суперсемейству рецепторов, связанных с гетеротримерными ГТФ-связывающими белками [Zhu et al., 2003]. У шпорцевой лягушки обнаружен только один белок из этого семейства с мембранной локализацией [Zhu et al., 2003]. Инъекция антител против этого рецептора в ооциты ингибирует их созревание как под действием прогестерона, так и тестостерона [Josefsberg et al., 2007]. За перенос и правильную локализацию на мембране рецептора отвечает белок VLDLR (very-low-density lipoprotein receptor – рецептор липопротеинов очень низкой плотности). Известно, что он выполняет

функцию шаперона при транспортировке рецептора на мембрану [Nader et al., 2018]. Затем через белки APPL1 (адаптерный белок, содержащий гомологичный домен плекстрина, фосфотирозинсвязывающий домен и мотив лейциновой застежки-молнии) и Akt2 (протеинкиназа В) активируется главный фактор созревания – MPF (Mature promotion factor).

Изолированные ооциты переходят к мейотическому созреванию *in vitro* после добавления Пг [Masui, 1967] или инсулина, или инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1) в инкубационную среду [Maller, Koontz, 1981]. Показано, что ФК экспрессируют рецептор к инсулиноподобному фактору роста [Sadler et al, 2010]. При этом удаление ФК снижает чувствительность ооцитов к инсулиноподобному фактору роста на 75%. Однако неизвестно, как пересекаются сигнальные пути от инсулиноподобного фактора роста, с участием фосфоинозитолкиназы и Akt/РКВ с последующей активацией фосфодиэстеразы, с молекулярными каскадами от стероидных гормонов для созревания ооцитов. Стероидные и пептидные сигнальные пути могут работать вместе аддитивно или синергично, но выяснение этого требует дальнейших исследований. Тем не менее, можно заключить, что ФК и ооцит тесно взаимодействуют для поддержки или возобновления мейотического деления.

Недавно было показано, что ооциты, лишенные своей фолликулярной оболочки, переходят к аномально быстрому созреванию, при котором формируется незакрепленное аномальное мейотическое веретено [Martoriati et al., 2023]. Авторы показали новый механизм с участием интегринов, обеспечивающий правильное созревание и прикрепление веретена к плазматической мембране. Способность интегринов ооцитов взаимодействовать с киназой фокальной адгезии и формировать гетеромерный комплекс снижается в присутствии фолликулярных клеток. Т.е. ФК могут модулировать формирование сигнальных путей, чтобы избежать нежелательной преждевременной прогрессии мейоза.

В конце периода роста ооцит отвечает на внеклеточный сигнал, вырабатываемый ФК под контролем гонадотропина. Пг может преобразовываться



в ооците в андрогены с участием 17-гидроксилазы, которая экспрессируется исключительно в ооцитах [Thiber-Fouchet et al., 1976; Mulner et al., 1978; Yang et al., 2003]. Андрогены андростендион и тестостерон далее могут преобразоваться в эстрон и эстрадиол-17 $\beta$  в результате реакции с участием изоформы цитохрома P-450 ароматазы [Gohin et al., 2011]. Эстрадиол-17 $\beta$  является ключевым гормоном в индукции вителлогенеза. Ароматаза экспрессируется вителлогенными ооцитами и фолликулярными клетками на этих стадиях. При этом суммарная активность фермента в фолликулярных клетках выше, чем в ооците более чем в 2 раза. Экспрессия ароматазы и ее активность резко падают в позднем оогенезе (стадия VI). Таким образом, как ооциты средних размеров, так и их фолликулярные клетки способны продуцировать эстрадиол-17 $\beta$  из андрогенов. Наличие в ооцитах 17-гидроксилазы и ароматазы позволяет синтезировать эстрадиол-17 $\beta$  из Пг [Gohin et al., 2011]. Просуществовавшая почти 20 лет двухкомпонентная модель регуляции синтеза эстрадиол-17 $\beta$  в яичнике (тека и фолликулярные клетки) была дополнена третьим участником – ооцитом. Возможно, существует взаимодействие между ооцитом и его соматическими компартментами, направленное на регуляцию продукции эстрадиола-17 $\beta$ .

Рецепторы к эстрадиолу-17 $\beta$  обнаружены в фолликулах и ооцитах на вителлогенной и поствителлогенной стадиях (IV и VI стадии), и уровень их мРНК остается стабильным в период позднего вителлогенеза и созревания. Ингибиторный эффект эстрадиола-17 $\beta$  на созревание опосредован фолликулярными клетками. Показано, что эстрадиол препятствует в ФК превращению прегненолона в Пг под действием гонадотропных гормонов [Lin et al., 1988; Gohin et al., 2011].

Хорошо известно, что инъекция хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) индуцирует овуляцию у *Xenopus*, поскольку этот гормон имеет структурное сходство с ЛГ и активирует тот же рецептор ЛГР. После стимуляции фолликулов лягушки гонадотропинами происходит увеличение продукции трех основных стероидов: – прогестерона (ПГ), тестостерона и эстрадиола [Fortune, 1983; el-Zein et al., 1988]. Ингибирование синтеза андрогенов приводит к задержке и блоку

овуляции [White et al., 2005], тогда как модуляция количества классического рецептора к Пг и его активности влияет на созревание ооцитов, индуцированное Пг, незначительно, что наводит на мысль о другом пути действия Пг [Bayaa et al., 2000; Tian et al., 2000]. Несмотря на это, прогестерон является главным стероидом, который продуцируется фолликулярными клетками в ответ на ЛГ. Его добавление к изолированным от оболочек ооцитам в низких микромолярных концентрациях индуцирует мейотическое созревание, а также его уровень внутри ооцитов резко возрастает до микромолярных концентраций во время вхождения в мейоз [Jacobelli et al., 1974; Reynhout et al., 1975; Haccard et al., 2012]. Хотя эффективная концентрация тестостерона для созревания *in vitro* ооцитов без оболочек ниже в 10 раз эффективной концентрации прогестерона, после стимуляции ЛГ уровень прогестерона достигал своего максимального значения (100 нМ) уже через час, тогда как концентрация андрогенов нарастала медленно. Возможно, что оба типа стероидов участвуют в мейотическом созревании ооцитов *Xenopus*, учитывая высокий уровень фермента 17-гидроксилазы в ооцитах, превращающего прогестин в андрогены [Yang et al., 2003; Deng et al., 2009].

В зрелых и стимулированных к созреванию ооцитах обнаружены сульфатированные водорастворимые формы прегненолона и дегидроэпиандростерона, причем количество дегидроэпиандростерона значительно превосходило содержание всех прочих стероидов в фолликуле и ооците [Haccard et al., 2012]. Авторам не удалось обнаружить сульфотрансферазную активность в ооцитах, а потому, по-видимому, фермент локализован в ФК. Сульфатированные водорастворимые формы могут проникать в ооцит через щелевые контакты. Существенной сульфатазной активности в ооцитах обнаружено не было. При инъекции в ооцит сульфатированная форма дегидроэпиандростерона не вызывала созревания и не влияла на созревание под действием прогестерона и тестостерона. Полагают, что превращение гормонов в ФК в неактивные сульфатированные формы может являться защитной системой от гормональных флюктуаций и преждевременного созревания ооцитов.

В ооцитах был идентифицирован классический рецептор к андрогенам (AR) с ядерной локализацией регулирующий тестостерон-опосредованное созревание [Lutz et al., 2001]. Снижение экспрессии рецептора, а также инкубация с антагонистом подавляет созревание ооцитов и активацию киназ. Выяснилось, что 5% рецептора локализуется у поверхности ооцита, и, возможно, отвечает за негеномные эффекты андрогенов [Lutz et al., 2001; Lutz et al., 2003]. Прогестерон связывается с AR с той же аффинностью, что и с собственным рецептором [Evaull et al., 2007].

Общепринято считать, что в поддержании блока мейоза у позвоночных ведущая роль принадлежит цАМФ [Racowsky, 1984; Dekel et al., 1988]. Снижение внутриклеточного уровня цАМФ и протеинкиназы А является необходимым условием созревания [Dekel, Beers, 1978; Vилlecсо et al., 2000; Conti et al., 2002]. В поддержании высокого уровня цАМФ в растущем ооците *Xenopus* играют роль субъединицы  $G\alpha_s$  и  $G\beta\gamma$  гетеротримерного G-белка, которые конститутивно активны. Ингибирование какой-либо из субъединиц усиливает стероид-индуцированное созревание [Gallo et al., 1995; Sheng et al., 2001; Sheng et al., 2005]. Постоянной активностью субъединицы обязаны мембранному рецептору GPR3 семейства GPCR, конститутивно активному без лиганда [Deng et al., 2008; Rios-Cardona et al., 2008; Mehlmann et al., 2004; Mehlmann, 2005]. При индукции созревания ХГЧ рецепторы протеолитически расщепляются металлопротеиназой [Deng et al., 2008]. Инактивации GPR3, однако, недостаточно для созревания ооцитов.

Высокий уровень цАМФ в ооците поддерживает протеинкиназу А в активном/диссоциированном состоянии, которая фосфорилирует ряд белков. На млекопитающих показано, что активация протеинкиназы А, присутствующей в клетках гранулезы, стимулирует возобновление мейоза, а стимуляция фермента в ооцитах, наоборот, блокирует их созревание [Downs, Hunzicker-Dunn, 1995]. Такой же эффект наблюдается при действии ингибиторов фосфодиэстеразы 3 – в ооцитах ферменты блокируют созревание, индуцированное гонадотропинами, а ингибирование фосфодиэстеразы 3 в клетках гранулезы приводит к

возобновлению мейоза и овуляции в отсутствие ЛГ [Tsafriri et al., 1996]. Позже на шпорцевой лягушке было подтверждено участие протеинкиназы А и фосфодиэстеразы в созревании ооцитов. Конти с соавторами полагают, что для созревания необходима активация нескольких молекулярных путей, точкой пересечения которых является снижение уровня цАМФ [Conti et al., 2002].

Наличие фолликулярных оболочек снижает эффективность действия внешнего тестостерона и Пг на два порядка [Haccard et al., 2012]. Таким образом, фолликулярный слой может служить барьером для проникновения гормонов к ооциту и ингибировать индукцию созревания внешними свободными стероидами [Mulner, Ozon 1981; Patino, Purkiss, 1993; Haccard et al., 2012]. При воздействии низких концентраций Пг (0,25-1 мкг/мл) на фолликул гормон, по-видимому, связывается фолликулярными клетками и не достигает поверхности ооцита. Однако, созревание ооцитов происходит с участием фактора нестероидной природы, синтезируемого фолликулярными клетками и поступающего в ооцит через щелевые контакты [Скоблина, 2004].

ФК несомненно участвуют в поддержании блока мейоза. На мыши показано, что в фолликулах яичников ЛГ вызывает МАРК-зависимое фосфорилирование 43 коннексина щелевых контактов. После фосфорилирования снижается проницаемость щелевых каналов между клетками гранулезы, но не между кумулюсом и ооцитом [Norris et al, 2008]. Следующим шагом является возобновление мейоза. Вышесказанное позволяет предположить, что сигналы от окружающих соматических клеток удерживают ооциты в профазе и что прерывание такой коммуникации является стимулом, который вновь запускает мейоз. Предполагают, что циклический ГМФ может представлять собой критически важную молекулу в этой системе [Norris et al., 2009]. На амфибиях также есть данные об участии ФК в поддержании блока мейоза. У некоторых представителей хвостатых и бесхвостых амфибий, в том числе у шпорцевой лягушки, удаление слоя ФК вызывает спонтанное созревание закончивших рост ооцитов, собранных в репродуктивный период [Vilain et al., 1980; Kwon et al., 1989; Zelaraugan et al., 1995]. Высокий уровень фосфолипидов (фосфатидилхолина

и фосфатидилинозитола) и вторичных посредников (диацилглицерола – ДАГ, инозитолтрифосфата – ИТФ) в цитоплазме таких ооцитов делает возможным созревание в отсутствие ингибиторов, поступающих из ФК (например, цАМФ) при разобщении щелевых контактов. У *Bufo arenarum* показана активация  $G\alpha_i$ , подавляющей АЦ и протеинкиназу А [Zelarayan et al., 2012].

Установлено, что предсердный натрийуретический пептид локализуется в яйцеводе млекопитающих [Russinova et al., 2001], яичнике [Steegers et al., 1990], фолликулярной жидкости [Anderson et al., 1994], клетках гранулезы [Ivanova et al., 2003] и ооцитах [Kim et al., 1993]. Натрийуретический пептид может влиять на созревание яйцеклетки под действием цГМФ, т.е. он участвует в развитии яйцеклетки путем стимуляции накопления цГМФ и активации цАМФ-фосфодиэстеразы, и таким образом способствует созреванию яйцеклетки *Xenopus* [Sandberg et al., 1993]. Натрийуретический пептид ингибирует действие ФСГ и форсколина на созревание свиных яйцеклеток через различные рецепторы и сигнальные пути [Zhang et al., 2005].

Ингибирование пути MAPK подавляет разрушение зародышевого пузырька (germinal vesicle breakdown – GVBD, разборка ядерной оболочки ооцита) и разрыв фолликулярных оболочек, тогда как ингибирование активности матриксной металлопротеазы задерживает овуляцию, не влияя на GVBD. Это подтверждает, что и MAPK, и матриксная металлопротеаза участвуют в высвобождении ооцитов из овариальных фолликулов у лягушек. Предположительно, овуляция происходит в результате ограниченного протеолиза в апикальной области фолликулов с помощью матриксной металлопротеазы [Sato, Tokmakov, 2020].

Исследования, проведенные в ряде биологических систем, показали, что взаимодействие соматических и зародышевых клеток играет важную роль, как в зародышевой линии, так и в физиологических функциях половозрелой гонады. Поэтому оогенез можно рассматривать как взаимозависимый процесс, в котором соматические клетки фолликула и ооцит проходят через различные стадии. При этом происходит последовательный обмен сигналами, способствующий продвижению от одного этапа к другому. Более того, ооциты и фолликулярные

клетки могут находиться под контролем различных факторов независимо друг от друга, однако их взаимовлияние бесспорно.

Соматический компартмент важен для обеспечения прохождения гормонального и молекулярного сигнала, который влияет на рост и созревание ооцита. Во время же блока мейоза клетки фолликула обеспечивают нормальное протекание процессов роста, предохраняют ооцит от преждевременного созревания и обеспечивают компетентность ооцита к оплодотворению [Zuccotti et al, 2011; Kidder, Vanderhyden, 2010]. Во время фазы роста вителлогенин также поступает из ФК в ооцит. Молекулярные сигналы от ФК поступают в ооцит через щелевые контакты. При созревании эти контакты разрываются. Стоит отметить, что эволюционно этот механизм сохранился в ряду *C. elegans*, *Xenopus* и млекопитающими [Von Stetina, Orr-Weaver, 2011]. Показано, что ооцит влияет на стероидогенез в окружающих его ФК, что свидетельствует о диалоге между ооцитом и соматическим компартментами фолликула яичника [Sretarugsa, Wallace, 1997].

### 3 МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1 Реактивы

В работе использовались следующие реактивы: NaCl (Panreac, Испания), KCl (Helicon, Россия), CaCl<sub>2</sub> (Helicon, Россия), MgSO<sub>4</sub> (Helicon, Россия), HEPES (Fluka, Швейцария), EDTA (AppliChem, Германия), хорионический гонадотропин человека (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия), коллагеназа IA (SigmaC2674), этанол (Химмед, Россия), изопропанол (Химмед, Россия), фенол (Sigma, США), MnCl<sub>2</sub> (Sigma, США), NaOH (Chemapol, Чехия), уксусная кислота (Лавернастрой инжиниринг, Россия), ацетон (Химмед, Россия), (Лавернастройинжиниринг, Россия), формальдегид (Sigma, США), глутаровый альдегид (Sigma, США), гентамицин (ФГУП «Мосхимфармпрепараты» имени Н.А. Семашко, Россия), ампицилин (AppliChem, Германия), канамицин (AppliChem, Германия), L-цистеин гидрохлорид (Fluka, Швейцария), триэтаноламин гидрохлорид (Sigma, США), диметилсульфоксид (DMSO) (Sigma, США), диэтилпиروкарбонат (DEPC) (Amresco, США), Tris Base (Amresco, США), EGTA (Sigma, США), PBS (Amresco, США), MOPS (Sigma, США), PIPES (AppliChem, Германия), CHAPS (Sigma, США), цитрат натрия (Panreac, Испания), уксусный ангидрид (Sigma, США), малеиновая кислота (Sigma, США), фиколл (Sigma, США), параформальдегид (Sigma, США), формаид (Panreac, Испания), Tween-20 (Sigma, США), Torula RNA (Sigma, США), бычий сывороточный альбумин (Sigma, США), дитиотриэтол (DTT) (Promega, США), агароза (Amresco, США), бромистый этидий (Helicon, Россия), бромфеноловый синий (Fermentas, Германия), Среда Лурия-Бертани (LB) (Amresco, США), маркер длины ДНК 100 и 1000 п.н. (Fermentas, Германия), beta-меркаптоэтанол (Sigma, США), бактериальный агар (Amresco, США), 10X буфер для проведения ПЦР (Fermentas, Германия), смесь дезоксинуклеотидов (dNTP) (Fermentas, Германия), смесь рибонуклеотидов (rNTP) (Promega, США), ribo m7G Cap analog (Promega, США), dig-UTP (Roche, Германия), субстрат для щелочной фосфатазы (BM Purple) (Roche, Германия), обезжиренное сухое молоко, нормальная овечья сыворотка

(Sigma, США), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma, США), TRIZOL (Invitrogen), ExtractRNA (Евроген), RNAlater (Евроген), витальный липофильный краситель FM 4-64FX (Invitrogen, США), парафиновая среда для гистологической заливки Histomix (БиоВитрум, Россия), среда для заключения живых препаратов BioMount (БиоВитрум, Россия), о-ксилол (Химмед, Россия), смола Эпон 812 (EMS, США), краситель гематоксилин Эрлиха, краситель толуидиновый синий, набор для выделения ДНК DNA Purification System (Promega, США), набор для выделения ДНК из агарозного геля QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США), Набор «ПЦР-Микс» (2,5х реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green и референсного красителя ROX) (Синтол, Россия), 10X DIG RNA Labeling Mix (Roche, Cat #11277073910, Швейцария), DAPI (1 мкг/мл; Invitrogen Cat #D1306), HCl (Лавернастройинжиниринг, Россия), хлорид лития LiCl (Fluka, Швейцария), NBT/BCIP субстрат для щелочной фосфатазы (Roche Cat #11681451001, Швейцария), Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Ленреактив, Россия), PBS (Amresco, США), PFA (Sigma, США), Roshe Blocking reagent (Roche, Германия), Torula RNA (Sigma, США), Triton X-100 (Amresco, США), глицин (Amresco, США), каcodedиловая кислота (Serva, Германия), маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder (Евроген Кат. #NL001, Россия), метанол (Химмед, Россия).

### ***3.2 Лабораторное оборудование***

В данной работе использовали: стереоскопический бинокулярный микроскоп МПС-1 ЛОМО (Россия), бинокулярный микроскоп Olympus SZX9, бинокулярный микроскоп Olympus U-TV1X, осветитель HGJ3 Fiber Opticak Illuminator Лабкомплекс с микротомом Меорта, водяная баня Biosan WB-4MS, термостат настольный Термит ДНК-технология, весы аналитические Adventurer (Ohaus, Китай), ламинарный бокс С-1,2 БАВп-01 (Ламинарные системы, Россия), автоматические дозаторы Eppendorf Research (Eppendorf, Германия), Лабпипет (Россия) и BioHit (Финляндия), микроинъектор Nanoject II (Drummond Scientific Company, США), стеклянные иглы 7" Drummond, магнитная мешалка Biosan MSH-300i, сканирующий электронный микроскоп CamScan S-2 (Tescan),



трансмиссионный электронный микроскоп JEM-1011 с моделью камеры Gatan ES500W Model 782, конфокальный микроскоп Leica SP5 или Olympus FluoView FV10i, система гель-документации BioRad, шейкер Biosan MR-1, термоциклер Eppendorf mastercycler grade, центрифуга настольная Eppendorf Minispin plus, центрифуга настольная Eppendorf 5430R с охлаждением, вортекс microspin FV-2400, ПЦР-амплификатор Mastercycler gradient (Eppendorf, Германия), система ПЦР в реальном времени Applied Biosystems StepOne Plus, камера для электрофореза ДНК и РНК Helicon, блок питания для электрофореза PowerPac Basic (Bio-Rad, США), камера для белкового электрофореза и блоттинга Bio-Rad, спектрофотометр Nanodrop 2000 Thermo Scientific, термостат Binder, трансиллюминатор Vilber Lourmat esx-15m.

### **3.3 Среды и растворы.**

MMR (1×): 5M NaCl, 1M KCl, 1M CaCl<sub>2</sub>, 1M MgSO<sub>4</sub>, 1M Hepes ,0.5M EDTA (Promega) на дистиллированной воде.

DEPC-вода: к деионизованной воде (milliQ) добавляется 1 мл 0.1% диэтилпиروкарбоната (DEPC), перемешивается на мешалке и инкубируется 1 час при 37°C, затем автоклавируется.

TBS: 0.05 M Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6.

EBC: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1.0% NP-40.

SB Буфер для нанесения образцов (4X) в ПЛАГ: 200мМ Tris-HCl (pH 6.8), 400мМ β-меркаптоэтанол, 4% SDS, ~0.01% бромфеноловый синий, 40% глицерин.

Трис-глициновый буфер: Tris-base 25mM, Glycine 250mM, SDS 0.1%.

Разрешающий гель: акриламид: бисакриламид 29:1, Tris-Cl pH 8.8 375мМ, SDS 0.1%, PSA 0.1%, TEMED 0.08%.

Концентрирующий гель: AA 5%, Tris-Cl pH6.8 0.13M, SDS 0.1%, PSA 0.1%, TEMED 1мкл/мл.

Буфер для переноса: 192 mM глицин, 25 mM Tris -HCl pH 8.3, 20% метанол.

50X TAE для электрофореза в агарозном геле нуклеиновых кислот: 2M Tris-HCl, 1.56 M уксусная кислота, 50 mM EDTA.

5x буфер для нанесения нуклеиновых кислот в агарозный гель: 0.25% бромфенолового синего, 0.25% ксиленцианола, 30% глицерина.

PBS (1x): 1 таблетка на 1 литр дистиллированной воды, автоклавированный;

PBST: PBS + 0.1% Tween 20

MEMFA: 0.1 М MOPS pH 7.4, 2 мМ EGTA, 2 мМ MgSO<sub>4</sub>, 3.7% формальдегид.

PTw: PBS, 0.1% Tween-20.

Гибридизационный буфер: 50% формамид, 5x SSC, 1x раствор Денгардта, 0.1% Tween-20, 0.1% CHAPS, 10 мМ ЭДТА, 1 мг/мл Torula РНК, 0.1 мг/мл гепарина.

SSC: 0,15 М NaCl, 0,015 М цитрат натрия. Довести pH=5.5 и pH=7 с помощью HCL.

PFA/PTw (4%): чтобы растворить PFA добавляли несколько капель 10N NaOH и нагревали до +58°C. Затем раствор доводили до pH=7.2-7.4 с помощью концентрированного HCL и 10N NaOH.

MAB (1x): малеиновая кислота 100 мМ, NaCl 150 мМ, Буфер доводили до pH=7.5 .

NaOH (10N): хранили на +4°C.

MgCl<sub>2</sub> (1M): стоковый автоклавированный раствор.

NaCl (5M): стоковый автоклавированный раствор.

TEA (1%): триэтаноламин гидрохлорид на PTw.

Tris (1M): стоковый раствор, довести pH=9.5 с помощью HCl, автоклавировать.

L-15: 50% Leibowitz (Sigma), 1мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 100 мкг/мл гентамицина, 1 ед пенициллина, 1 мкг/мл стрептомицина, 1мМ L-глутамина, 1мкг/мл инсулина, 15мМ HEPES (pH 7.8), 50 ед/мл нистатина

Среда Луриа-Бертани (LB): 25 г сухой среды LB на 1 л дистиллированной воды, автоклавированная.

Раствор Денгардта: 0.02% фиколл, 0.02% поливинилпирролидон, 0.02%, бычий сывороточный альбумин.

МAB: 100 мМ малеиновая кислота, 150 мМ NaCl pH 7.5.

Хлорид лития (8М): автоклавированный, аликвоты хранили при - 20°C.

Ацетат натрия (3М): на воде высокой степени очистки, pH = 5.2.

Буфер для щелочной фосфатазы: 100 мМ Tris HCl, pH 9.5, 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ NaCl, 0.1% Tween 20, 2 мМ Levamisol.

Хромогенный субстрат для щелочной фосфатазы: 0.33 мг/мл NBT (nitro blue tetrazolium), 0.17 мг/мл BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate).

Буфер для фиксации фолликулов для ЭМ: 4% формальдегид, 0,1% изоальдегид, 100 мМ KCl, 3мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ HEPES, 150 мМ сахараза, 0.1% Triton X-100 pH 7.6.

Глутаровый альдегид (2.5%): стоковый раствор 25% глутарового альдегида на промывочном буфере;

Какодилатный буфер (0.2 M): 21.4 г какодиловой кислоты на 50 мл дистиллированной воды. Буфер доводили до pH=7.2-7.4 концентрированным NaOH.

Промывочный буфер: 2.5 мл 0.2 M какодилатного буфера, 150 мг NaCl, 0.5 мл 0.5% MgCl<sub>2</sub> для 10 мл промывочного буфера.

Эпоновая среда: Epon 812, DDSA (dodecenyyl succinic anhydride), MNA (methyl nadic anhydride), DMP 30 (dimethylaminomethylphenol).

Цитрат свинца (по-Рейнольдсу): 1.32 г Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1.76 г безводного цитрата натрия в 50 мл дистиллированной воды. Довести pH=12 с помощью 10N NaOH.

Коммерческие наборы:

- Mint для обратной транскрипции (Евроген Кат. #SK001, Россия);
  - Plasmid Miniprep для выделения плазмид (Евроген Кат. #BC021L, Россия);
  - Quick-TA kit (Евроген Кат. #ТАК02, Россия);
  - mMESSAGE mMACHINE™ T7 и SP6 Transcription Kit для синтеза РНК (Invitrogen Cat #AM1344 и Cat #AM1340, США);
- Ферменты (не из коммерческих наборов)

- RNase-free ДНКаза I (1 Ед/мкл; Thermo Scientific Cat #EN0521, США);
- Sp6 РНК-полимераза (200 Ед/мкл; Thermo Scientific Cat #EP0133, Литва);
- T7 РНК-полимераза (200 Ед/мкл; Thermo Scientific Cat #EP0113, Литва);
- Taq ДНК-полимераза (50X, 5 Ед/мкл; Евроген Кат. #PK113Н, Россия);
- Протеинкиназа К (900 Ед/мл; Fermentas Cat #EO0491, Германия).
- Лигаза (1000 Ед/мкл; Евроген Кат. #LK001, Россия)

### 3.4 Методы исследования

#### *Получение ооцитов и эмбрионов in vitro*

Ооциты разных стадий были выделены вручную диссекцией из яичников половозрелых самок *X. laevis*, *X. tropicalis*, *H. Boettgeri*, *R. Temporaria*, *B. Bufo*, *B. bombina*. Все манипуляции с животными производили согласно европейскому закону по биоэтике от 24 ноября 1986г (86/609/ЕЕС).

Для отделения фолликулярных оболочек от ооцитов *X. laevis* стадий I–III фолликулы инкубировали в растворе коллагеназы (2 мкг/мкл) на горизонтальном шейкере 2–3 часа при 37°C до полной диссоциации. Оболочки ооцитов V–VI стадии (50–70 шт.) отделяли вручную с помощью пинцетов в растворе MMR (с 2х-кратной концентрацией NaCl).

Для получения зрелых ооцитов самкам *X. laevis* инъецировали 500-600 единиц хорионического гонадотропина человека. Стимуляция и вымет икры наступал через 10 часов. Зрелые ооциты VI стадии сдаивали в сухую чашку Петри, добавляли 1 мл суспензии части семенника в 0.5x MMR и быстро перемешивали в течение 1-2 минут. Таким образом, проводили оплодотворение *in vitro*. Затем к яйцам добавляли 0.1x MMR и следили за дальнейшим развитием. Для снятия желточной оболочки 0.1x MMR заменяли на раствор цистеина до 3 минут с постоянным покачиванием. Затем эмбрионы отмывали от раствора цистеина в 0.1x MMR.

### *Получение проб из ооцитов и зародышей лягушек*

Для получения тотальной РНК в различных экспериментах фолликулы разных стадий, ооциты и фолликулярные оболочки с них (до 100 мг ткани), а также эмбрионы лизировали в 1 мл фенола и гуанидин-изотиоционата под коммерческими названиями TRIZOL (Invitrogen) или ExtractRNA (Евроген). Для измельчения и лучшего растворения ткани прибегали к пипетированию или использованию пестика/гомогенизатора. Затем образцы инкубировали 10-15 минут и центрифугировали на максимальной скорости при 4°C для удаления нерастворенных фрагментов.

Для белкового электрофореза или Вестерн-блоттинга ооциты и эмбрионы, соответствующих стадий, гомогенизировали в буфере EBC с добавлением 100X коктейля ингибиторов протеаз (Roche) на льду. Затем центрифугировали 10 минут для удаления дебриса, а к супернатанту добавляли 4x буфер для нанесения и прогревали 10 минут при 90-100°C.

### *Получение и очистка антител*

Существует множество различных протоколов для получения поликлональных антител. Для данной работы в качестве продуцента были выбраны кролики, поскольку являются наиболее удобным объектом в лабораторных условиях. Также кроличьи антитела обладают более широким спектром распознаваемых эпитопов антигена, возможностью распознавать небольшие молекулы, а также сайты модификации белков. Для этого были куплены 3 кролика линии Белые Новозеландские (New Zealand White Rabbits) возрастом до полугода. После всех процедур иммунизации была собрана сыворотка от кролика с наибольшим титром антител. Иммунизацию всех животных проводили одновременно. Метод основан на выработке антител в ответ на введенный чужеродный белок (антиген) в присутствии стимуляторов [Дэвени, Гергий, 1976; Howard, Kaser, 2007].

Для начала нужно было получить антиген для иммунизаций. Конструкт полноразмерной кодирующей последовательности гена, слитой на N-конце с глутатион-S-трансферазой (GST), в плазмидном векторе pCS2+ был получен

ранее в нашей лаборатории. N-концевой пептид необходим для аффинной очистки белка. Рассчитанная масса белка Germes соответствует 69 кДа. Молекулярный конструктор (GST-Germes) использовался для индукции синтеза рекомбинантного белка в бактериях Rosetta штамма *E. coli* с помощью IPTG (масса около 90 кДа). Анализ лизатов и осадков с помощью электрофореза бактерий после 4х часов экспрессии рекомбинантного белка Germes показал, что белок в значительном количестве является нерастворимым. Для получения растворимого полноразмерного белка была задействована система с шаперонами GroEL и GroES [Nishihara et al, 1998]. Большая часть белка действительно стала растворимой, однако масса шаперона GroEL близка к массе Germes: около 65 кДа против 69 кДа, что все же мешало хорошему отделению белков в ПААГ. Поэтому этот вариант также был неподходящим. С помощью программы MFOLD [Mathews et al., 1999; Zuker, 2003] было определено, что в последовательности белка две растворимые части. Одна была выбрана для получения рекомбинантного белка (ак 378-502; всего 125 ак). Укороченная растворимая последовательность гена (solubleGermes - sGermes) также с GST пептидом на N-конце была клонирована в экспрессионный вектор (GST-sGermes). Электрофореграмма с лизатом белка GST-sGermes подтвердила, что часть последовательности белка (sGermes) является растворимой. Однако, рекомбинантный частичный белок синтезировался в бактериях в небольшом количестве, но достаточном для иммунизации. Рекомбинантный растворимый белок, был хроматографически очищен с использованием глутатион-сефарозы (Liu et al., 2014) по заказу в другой лаборатории.

Иммунизацию кроликов проводили 5 раз согласно стандартному протоколу [Wang et al., 2015] с полным и неполным адьювантом Фрейнда в качестве стимулятора выработки антител. Перед иммунизацией у кроликов была получена преимунная сыворотка, которую затем использовали в качестве отрицательного контроля. Через неделю-две после каждого цикла иммунизации также проводили отбор сыворотки для проверки ее активности с помощью иммуноэлектрофореза.

Иммунная сыворотка была проверена на специфичность с помощью вестерн-блоттинга. Оценку проводили с помощью полноразмерного белка Germes или слитого с различными концевыми метками: His-Germes, Myc-Germes и GFP-Germes, которые были оверэкспрессированы в ооцитах *X. laevis*, а также против рекомбинантного частичного Germes, слитого с His-пептидом, синтезированного в бактериях. Подтверждением, что антитела специфичны, являлось наличие полосы на одном уровне при окраске сывороткой и антителами против соответствующего концевого пептида в параллельном эксперименте.

Следующим этапом была очистка антител из полученной сыворотки. Ранее уже была проблема получения большого количества белка. Поэтому было решено использовать вектор для экспрессии pET-21d-2c [Ivanov et al., 2006], позволяющий получать большое количество белка. Для этого последовательность His-sGermes была клонирована в эту плазмиду. Затем sGermes экспрессировали в большом количестве в штамме Rosetta *E. coli* (15 кДа), концентрировали и наносили на ПААГ размером MAXI Cell XII BioRad. После переноса белков на PVDF мембрану положение целевого белка контролировали с помощью Panceu S, вырезали широкую полосу мембраны, тем самым отделяя нужный белок от остальных бактериальных белков. Для связи с антителами инкубацию мембраны производили в 2мл сыворотки, а затем связавшиеся АТ элюировали кислым глицином 6 раз.

#### *Работа с ДНК и РНК.*

##### *Трансформация бактерий *E. coli* плазмидами*

Для трансформации использовали компетентные клетки *E. coli* штамма *XL-blue* или *DH5 $\alpha$* . Использовали метод химической трансформации компетентных клеток. Аликвоту компетентных клеток (200мкл) размораживали на льду, затем добавляли 5-50 нг плазмидной ДНК. Смесь клеток и ДНК инкубировали на льду в течение 30 минут. Затем проводили воздействие теплового шока при 42°C в течение 30 сек. в водяной бане. Сразу же эппендорф переносили в лед на 5 мин, а затем добавляли 1 мл LB среды. Трансформированные клетки *E. coli* переносили на шейкер-термостат (37°C, 150 об/мин) и подращивали в течение 1 часа. Затем

клетки высевали на чашку со средой LB-агар с необходимым антибиотиком и культивировали в течение ночи при 37°C для получения колоний.

#### *Выделение плазмидной ДНК*

Для выделения плазмидной ДНК использовали наборы нескольких производителей: Promega, Евроген, Qiagen и другие. Все протоколы щелочного выделения имеют схожую последовательность шагов в методике: приготовление клеточного лизата, его очистка, адсорбция плазмидной ДНК на носителе, промывка и элюция. Далее приведен протокол, разработанный компанией Евроген. Для этого выросшую в течение ночи культуру бактерий, трансформированную плазмидой, осаждали 1 мин. в настольной центрифуге при максимальных оборотах (14000, далее везде, если не указано иначе). Осадок тщательно ресуспендировали в 250 мкл Ресуспендирующего буфера. Затем после добавления 250 мкл Лизирующего раствора осторожно перемешивали до прозрачного состояния (не более 1 мин.). Добавляли 350 мкл Нейтрализующего раствора, перемешивали и центрифугировали в течение 10 мин. В спин-колонку переносили осветленный супернатант и центрифугировали в собирательную пробирку 30 секунд. Плазмидную ДНК, сорбированную на колонке, промывали 2 раза добавлением 300 мкл Промывочного раствора и центрифугированием 30 сек., а затем элюировали 50мкл Элюирующего раствора.

#### *Рестриктная реакция.*

Для разрезания плазмидной ДНК использовали стандартное соотношение реактивов в объеме 25мкл:

- 2.5 мкл 10x буфера для рестриктазы
- 5 мкл плазмидной ДНК (0,5 мкг/мкл)
- 0.3 мкл фермента рестрикции
- 17.5 мкл H<sub>2</sub>O

Реакцию проводили в течение 1-2 ч. при рекомендованной производителем температуре, чаще 37°C.



*Очистка фрагментов ДНК (ПЦР-продуктов, ДНК после реакции рестрикции, фрагмент ДНК в агарозном геле)*

Для очистки фрагментов ДНК использовали набор компании Евроген. Для выделения ДНК-фрагмента из агарозного геля в пробирку добавляли 3 объема связывающего раствора и нагревали до 50°C для полного растворения геля. Для экстракции ДНК-фрагментов из реакционной смеси вносили 5 объемов связывающего раствора и перемешивали на вортексе. Далее для выделения растворы наносили на связывающую хроматографическую колонку и центрифугировали 30 сек. Затем колонку с ДНК промывали 700мкл Промывочным раствором, центрифугировали 1 мин. и элюировали 30-50 мкл mQ-H<sub>2</sub>O.

*Лигазная реакция* используется для сшивания ДНК-фрагментов, обработанных рестриктазами. Стандартный состав реакции в объеме 10мкл:

2 мкл 5x T4 ДНК буфера для лигазы (Fermentas/Евроген);

1 мкл ДНК-вектора 5 т.п.н. (30 нг/мкл);

1.5 мкл ДНК-вставки 500 п.н. (10 нг/мкл);

5.0 мкл H<sub>2</sub>O;

0.5 мкл T4 ДНК-лигазы (Fermentas/Евроген).

Количество ДНК-вставки и ДНК-вектора брали согласно молярному соотношению 10:1 (по количеству вещества). Реакцию проводили в течение ночи при 4°C, после чего для инактивации фермента смесь замораживали.

*Создание конструкторов для исследования элементов локализации в 3'НТО*

Полноразмерная кДНК *germes* (ORF и 3'НТО) была клонирована ранее в вектор pCS2+(Promega) [Berekelya et al, 2003]. 1-3, 3-4, 4-6, Для молекулярного клонирования фрагментов РНК 3'НТО *germes* амплифицировали необходимые области конструктора, используя ПЦР. Затем ПЦР-продукты обрабатывали рестриктазами XhoI и SalI, очищали на колонке и лигировали с pSP73(Promega) вектором, содержащим те же липкие концы. Таким образом, были созданы следующие конструкторы: fragmentX 3'UTR-pSP73, где X – фрагменты: 2-4, 4-5, 1-5, 2-5.

## *Молекулярное клонирование коротких последовательностей germes из разных амфибий*

Образцы кДНК разных лягушек использовали в качестве матрицы. Для проведения ПЦР использовали вырожденные олигонуклеотиды, специфичные для наиболее консервативного участка последовательностей *germes X. laevis* (GenBank ID: AY172320.1) и *X. tropicalis* (GenBank ID: XM\_031898981.1). Полученный ампликон клонировали в вектор pGEMT (Promega, США) или pAL-TA (Евроген, Россия).

### *Выделение тотальной РНК*

К лизату добавляли 200 мкл хлороформа, перемешивали, инкубировали 5 минут и центрифугировали при 4°C 15 минут. Образовывалось 3 фазы, в верхней водной содержится РНК. Верхнюю фазу отбирали и использовали для осаждения РНК. Для этого добавляли 500 мкл изопропанола, инкубировали 10 минут и снова центрифугировали 10 минут RT. Надосадочную жидкость заменяли на 1.5 мл 75% этанола и снова центрифугировали 5 минут. После всю жидкость отбирали пипеткой, а осадок высушивали на воздухе с открытой крышкой на столе.

После все образцы были обработаны ДНКазой для удаления гДНК. Для этого к РНК (до 10 мкг) добавляли: 5 мкл 10 х буфера для ДНКазы, 1 мкл ДНКазыI и доводили до 50 мкл DEPC-водой. Инкубацию проводили при 37°C 30 мин. По окончании реакции смесь замораживали. Затем РНК без примеси ДНК переосаждали. Для этого к РНК добавляли 5 мкл 5 М ацетата аммония и 150 мкл 96% этанола, перемешивали на вортексе и инкубировали 1 час при -20°C. Затем образцы центрифугировали 20 минут, супернатант удаляли и добавляли 300 мкл 70% этанола. Снова перемешивали содержимое и центрифугировали 10 минут. Отмывку 70% этанолом проводили 3 раза. Далее супернатант убирали, и РНК высушивали на воздухе с открытой крышкой. РНК растворяли в 10 – 20 мкл DEPC-воды.

### *Синтез кДНК*

Для синтеза первой цепи кДНК готовили смесь mQ-H<sub>2</sub>O, тотальной РНК-матрицы (1-5 мкл) и 10 мкМ смеси гексаолигонуклеотидов, прогревали 10 минут

на 60°C и охлаждали на льду для отжига праймеров. Затем к смеси добавляли: 10x буфер, dNTP's 0.4 mM каждого, ингибитор РНКаз RiboLock 0.5 мкл и обратную транскриптазу MMLV (100 ед.). После смесь инкубировали 2 ч. при 42°C в воздушном термостате. Реакцию останавливали замораживанием.

#### *Синтез РНК для микроинъекций*

Необходимые ДНК-конструкты (GermesORF-pcS2+, GFP-Germes-pcS2+, MT-Germes-pcS2+, His-Germes-pcS2+), линеаризовали по рестрикционному сайту NotI после вставки, а затем осуществляли синтез РНК *in vitro* с T7промотра. После линеаризованные ДНК-конструкты очищали с использованием набора Евроген.

Схема смеси реакции для синтеза РНК:

до 20 мкл MQ;

по 2 мкл каждого рибонуклеотида;

2 мкл Cap аналог;

2 мкл 10X буфера;

1 мкг линейной ДНК матрицы;

2 мкл РНК полимеразы.

Реакцию проводили 2 часа при 37°C. После пробу обрабатывали ДНКазой для удаления ДНК матрицы (добавить 1 мкл ДНКазы 1 и инкубировать на 37°C 15 минут). По окончании реакции смесь замораживали. Далее РНК осаждали. Добавляли 30 мкл mQ, 50 мкл хлорида лития и осаждали при -20°C 15 минут. Центрифугировали 15 мин, осадок промывали 3 раза 300 мкл 70% этанола, центрифугировали 5 минут каждый раз, а затем высушивали RT. РНК растворяли в 20 мкл DEPC-воды.

#### *Создание флуоресцентных РНК зондов:*

Конструкт fragment1-6 3'UTR-pSP73 был линеаризован с помощью рестриктазы Sall, а pGermes-FL/pGermes-3'UTR с помощью рестриктазы HpaI. Синтез РНК проводили с помощью T7 или Sp6 полимеразы, соответственно, с добавлением в реакцию Alexa488-UTP или тетраметилродамин-UTP (Molecular

Probes) в соотношении 1:5 к смеси немеченых нуклеотидов. Смесь очищали с использованием колонок Sephadex G-50 Quick Spin (Roche).

#### *Спектрофотометрическое измерение концентрации ДНК или РНК*

Для измерения концентрации РНК или ДНК используется длина волны 260 нм. При использовании спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) необходимо всего 1-2 мкл раствора ДНК/РНК. Измерение и подсчет производится автоматически при помощи программного обеспечения прибора. Если концентрация очень большая (более 1 мкг), желательно развести образец в 10 раз и произвести измерение повторно.

#### *Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле*

Электрофорез ДНК использовали для анализа качества выделенной плазмидной ДНК, результатов ПЦР и рестриктных реакций. При этом использовали 1.0%-1.5% агарозу с бромистым этидием (1 мкг/мл) в качестве флюоресцентного красителя или SYBR green, если ДНК фрагменты необходимо было выделять из геля на этапе молекулярного клонирования. Перед нанесением к образцам добавляли 5x буфер для нанесения (0.25% бромфенолового синего, 0.25% ксиленианола, 30% глицерина). Используемое напряжение – 5 В/см геля. Для оценки массы ДНК-фрагмента использовали маркеры длины с молекулярным весом 100-1000 п.н. и 1-10 к.п.н.

#### *Обратная транскрипция*

Для синтеза кДНК для последующего использования в ПЦР или ПЦР-РВ использовали тотальную РНК. Для этого сначала производили отжиг рандомных или поли-Т олигонуклеотидов. Для реакции смешивали 0,05–2 мкг РНК, 1 мкл 0.5 нг олигонуклеотидов и DEPC-вода до 10 мкл. Инкубацию проводили 5 минут при 70°C, а после переносили в лед. Затем к смеси добавляли 2,5 мкл 10x M-MLV буфера, 4 мкл смеси dNTP (по 10 mM каждого), 0.5 мкл РНазина и 0.5 мкл M-MLV ревертазы. Смесь инкубировали 60 минут при 37 - 42°C.

#### *ПЦР-амплификация и ПЦР-РВ*

С помощью ПЦР-РВ можно оценить относительные уровни экспрессии мРНК в исследуемых образцах. Для каждой реакции подбирается специфическая

пара олигонуклеотидов (прямой S и обратный AS) к исследуемой последовательности ДНК. Примерный состав стандартной ПЦР в 25 мкл:

- 2.5 мкл 10x буфер для полимеразы;
- 1 мкл ДНК-матрица;
- 0.5мкл Прямой олигонуклеотид, 10pmol;
- 0.5мкл Обратный олигонуклеотид, 10pmol;
- 1мкл dNTP's, 2.5mM;
- 0.2 мкл ДНК полимеразы;
- 19 мкл H<sub>2</sub>O.

В различных ПЦР (аналитические, препаративные) использовали полимеразы: BioTaq (Fermentas), Pfu (Fermentas), Encyclo (Евроген).

ПЦР-РВ использовали в экспериментах по оценке уровня экспрессии *germes* в раннем развитии шпорцевой лягушки и зрелых ооцитах. Исследования ПЦР-РВ проводили с использованием амплификатора 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Относительные уровни экспрессии (RQ) рассчитывали с помощью метода  $\Delta\Delta C_t$  (Bookout et al., 2005), в качестве референсного гена использовали ODC. Накопление продукта реакции регистрировалось прибором с использованием флуоресцентного красителя qPCR-HS SYBR+LowROX. Для приготовления реакции использовали смесь 10x буфера для полимеразы, кДНК-матрицу, прямой и обратный олигонуклеотиды 10pmol каждый, dNTP's 2.5mM каждый, Taq ДНК полимеразу, интеркалирующий краситель SYBRGreen, пассивный референсный краситель ROX. Олигонуклеотиды подбирали с помощью сервиса NCBI Primer-BLAST (табл. 1). Схема реакции:

1. прогревание смеси 2 мин. 50°C;
2. предварительная денатурация 10 мин. 95°C;
3. денатурация 15 сек. 95°C;
4. элонгация 1 мин. 60°C, так 40 циклов;
5. диссоциация для построения кривой плавления.

ПЦР в исследовании экспрессии *germes* у амфибий

Для оценки наличия транскрипта *germes* в транскриптах амфибий использовали стандартную ПЦР реакцию. Олигонуклеотиды были подобраны к наиболее консервативному участку последовательностей *germes* *X. laevis* (GenBank ID: AY172320.1) и *X. tropicalis* (GenBank ID: XM\_031898981.1). Полученный ампликон клонировали в вектор pGEMT (Promega, США) или pAL-TA (Евроген, Россия) для последующего секвенирования.

Таблица 1. Использованные олигонуклеотиды:

Ген	Последовательность олигонуклеотидов
<i>germes</i>	5'-AAATGGCAGAATGTACACAGG - 3' 3'-GTGTAGTTATGAATGCAACAGATAA - 5'
<i>odc</i>	5'-GCCATTGTGAAGACTCTCTCCATTC - 3' 3'-TTCGGGTGATTTCCTTGCCAC - 5'
<i>germes</i> (intron-exon)	5'-GCAAGACTGGGATGTGAAGGAACAAAAT- 3' 3'-TAAAAAAAATGAAAAACAAAATAACT - 5'
fragment2-4 3'UTR- pSP73	5'-CAGACTCGAGAAAAAAATGTATTTTCATTTG-3' 5'-GAGCGTCGACATGAAGCCTTCTAAAGC-3'
fragment4-5 3'UTR- pSP73	5'-CATCCTCGAGTGCAAAATTGTCACTTG-3' 5'-CTGAGTCGACGTATTAATTAGAAGTTGTG-3'
fragment2-5 3'UTR- pSP73	5'-CAGACTCGAGAAAAAAATGTATTTTCATTTG-3' 5'-CTGAGTCGACGTATTAATTAGAAGTTGTG-3'
fragment1-5 3'UTR- pSP73	5'-TCATCTCGAGTATCACTTTCTGCACTTTTT-3' 5'-CTGAGTCGACGTATTAATTAGAAGTTGTG-3'
fragment1-3 3'UTR- pSP73	5'-TCATCTCGAGTATCACTTTCTGCACTTTTT-3' 5'-CAGAGTCGACAAAAAAATATATATATAAAT-3'
fragment3-4 3'UTR- pSP73	5'-GACACTCGAGATAACTTTTGAACCACACTG 5'-GAGCGTCGACATGAAGCCTTCTAAAGC-3'
fragment4-6 3'UTR- pSP73	5'-CATCCTCGAGTGCAAAATTGTCACTTG-3' 5'-CTGAGTCGACATAAAATATTTGAATTTATTGAGG-3'

Консервативный участок последовательности <i>germes X. laevis</i> - <i>X. tropicalis</i>	5'-TTGGGATAGTTATGACCTTC-3' 5'-TCCTCCTCCTTAAGTATGGCT-3'.
---	--

### *Секвенирование*

Секвенирование выполняли по заказу в коммерческих фирмах по методу Сэнгера. Длина прочтения до 1000 нуклеотидов. Полученные последовательности анализировали с помощью программы NCBI BLAST 2.

### *Микроинъекции*

Сар-мРНК конструкторов инъецировали в зиготы *X. laevis* через 40-50 мин после оплодотворения. Инъекции проводили при помощи микроинъектора Drummond Nanoject II в вегетативный полюс зародыша. мРНК инъецировали в объеме 4.6 нл mQ в концентрации 100 нг/мкл.

### *Анализ элементов локализации 3'НТО*

Ооциты получали из иссеченных яичников молодых лягушек. Для освобождения ооцитов от оболочек проводили инкубацию в среде L-15 с коллагеназой А (Sigma, 0.8 мг/мл) в течении 15-60 минут с покачиванием, пока ооциты не отделялись друг от друга. Затем ооциты I-II стадии отмывали три раза и переносили в свежую среду. Микроинъекции выполняли с помощью аппарата Eppendorf Femtojet в концентрации 1 мг/мл. После ооциты при 18°C культивировали в среде L-15 с добавлением 5-10% сыворотки *Xenopus*, содержащей вителлогенин в темноте.

### *Гибридизация in situ*

Синтез зонда для гибридизации. Для получения матрицы для синтеза РНК зонда против *germes* использовали плазмиду рCS2+-*germes*. Для этого плазмиду путем реакции рестрикции разрезали с помощью фермента BamHI, а для отрицательного контроля (РНК по лидирующей цепи) – NotI. Линейную форму

плазмидной ДНК очищали с помощью фенольной экстракции, а затем пересаждали изопропанолом.

На следующем этапе РНК зонды синтезировали с помощью транскрипции *in vitro*. Для синтеза анти-сенс зонда использовали *t7* РНК-полимеразу, для сенс зонда – *sp6* РНК-полимеразу. Состав реакции на 25 мкл в воде: 2.5 мкл 10x буфера для транскрипции, 5 мкл 0.1М дитиотриэтола, 2.5 мкл 10x смеси рибонуклеотидов (4 мМ АТФ, 4мМ ГТФ, 4мМ ЦТФ, 2.6 мМ УТФ, 1.4 мМ dig-11-УТФ), 1 мкг линейной плазмидной ДНК, 0.5 мкл 40 ед/мкл ингибитора РНКаз, 1.5 мкл 20 ед/мкл РНК-полимеразы (*sp6* или *t7*).

10x смесь рибонуклетидов: 4 мкл 100 мМ АТР, 4 мкл 100 мМ ГТР, 4 мкл 100 мМ СТР, 2.6 мкл 100 мМ УТР, 14 мкл 10 мМ dig-11-УТР (Boehringer), 11.4 мкл воды.

Реакцию проводили при 37°C 2 ч. По окончании реакции отбирали аликвоту для контроля качества синтеза РНК зонда. После в реакционную смесь добавляли 1 мкл 1 ед/мкл ДНКазы.

Гибридизация. Стандартный протокол на целых зародышах с хромогенной реакцией разработал (Harland, 1991). Фолликулы большого роста фиксировали в буфере MEMFA при комнатной температуре. Затем образцы постепенно проводили до 96% спирта в повышающих концентрациях и хранили при – 20°C. Инкубирование фолликулов с последовательными сменами растворов для регидратации проводили в растворах/смесях: этанол : вода 3:1, этанол : вода 1:1, этанол : РТw 1:3, 2 раза в РТw по 5-10 минут. Затем для увеличения проницаемости мембран образцы обрабатывали протеиназой К 10 мкг/мл 10 минут. После образцы два раза промывали 0.1 М раствором триэтанолamina pH 7.5 по 5 минут, в третий и четвертый раз к раствору добавляли триэтанолamina уксусный ангидрид из расчета 2.5 мкл на 1 мл раствора по 5 минут. Фолликулы повторно фиксировали в 4% параформальдегиде в РТw в течение 20 минут, затем отмывали раствором РТW 3-5 раз по 5 минут.



Предгибридизацию проводили при +60°C в течении 4-6 часов в буфере для гибридизации. Если необходимо, подготовленные образцы можно хранить при – 20°C длительное время.

Гибридизация проводили при +60°C в течение ночи в 0.5 мл буфера, содержащего 0.5 мкг синтезированного *in vitro* антисмыслового РНК-зонда. На следующий день гибридизационный буфер с зондом собирали и хранили при – 20°C для повторного использования. Образцы отмывали 10 минут при +60°C гибридизационным буфером, затем трижды 2х SSC по 20 минут также при +60°C. Фолликулы обрабатывали РНКазой А 20 мг/мл и РНКазой Т1 10 ед/мл в 2х SSC 30 минут при 37°C. После отмывали в 2х SSC 10 минут, и дважды по 30 минут в 0.2хSSC при +60°C. Затем образцы дважды промывали буфером МАВ по 15 минут, инкубировали 1 час в буфере МАВ, содержащем 3% обезжиренного сухого молока. Далее 1 час в том же растворе с 20% инактивированной теплом (55°C в течение 1 часа) нормальной овечьей сывороткой. Инкубацию с антителами к дигоксигенину 1:2000, конъюгированными с щелочной фосфатазой, проводили в том же растворе в течение ночи при +4°C. Отмывки от антител проводили буфером МАВ 10 раз, каждая по 1 часу.

Цветная реакция. Для хромогенной реакции с щелочной фосфатазой фолликулы дважды промывали буфером для щелочной фосфатазы по 5 минут. После добавляли новую аликвоту буфера с хромогенным субстратом для щелочной фосфатазы. Окрашивание проводили в темноте, в течение 7 часов, степень окрашивания контролировали визуально. После образцы фиксировали буфером MEMFA 2 часа при RT. Фон частично отмывали в 70% этаноле 2-3 часа при RT. Окрашенные образцы хранили в 96% спирте при +4°C.

#### *Гистологический анализ*

Фолликулы после гибридизации *in situ* с реакцией на щелочную фосфатазу переносили в раствор 15% глицерина/ 40% этанол, после чего обезвоживали в возрастающих концентрациях этанола и ацетона и заключали в эпоновую смолу (эпон 812 : DDSA : DNA : DMP30 = 9 : 7 : 4 : 0.4). После этого изготавливали

срезы толщиной 4 мкм, которые окрашивали кислым фуксином. После проводили анализ окрашивания ФК.

#### *In situ* гибридизация для электронной микроскопии

Использовали протокол из работы Билинского (Bilinski et al., 2010). Он схож с процедурой хромогенной *in situ* гибридизацией с целыми эмбрионами. РНК-зонд использовали тот же, что и для хромогенной гибридизации. Для фиксации использовали раствор: 4% формальдегид, 0.1% глутаральдегид, 100 мМ КСl, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ HEPES, 150 мМ сахараза, 0.1% Triton X-100 pH 7.6. Фолликулы фиксировали 2 ч, переводили в 96% этанол и регидратировали в понижающих концентрациях этанола (75%, 50% и 25%). Образцы промывали раствором РТw (PBS-0,1% Tween 20) 3 раза по 5 минут, 10 минут обрабатывали протеиназой К. После образцы два раза промывали 0.1 М раствором триэтаноламина pH 7.5 по 5 минут, затем еще два раза по 5 минут раствором триэтаноламина с уксусным ангидридом (2.5 мкл на 1 мл раствора ТЭА). Фолликулы повторно фиксировали в 4% параформальдегиде в РТw в течение 20 минут, затем отмывали раствором РТW 3-5 раз по 5 минут.

Предгибридизацию проводили при +60°C в течение 4-6 часов в буфере для гибридизации. Гибридизацию проводили при +60°C в течение ночи в 0.5 мл буфера, содержащего 0.5 мкг синтезированного *in vitro* антисмыслового РНК-зонда. На следующий день гибридизационный буфер с зондом собирали для хранения при -20°C для повторного использования.

Отмывки фолликулов выполняли раствором гибридизационного буфера и 2xSSC/0.3% CHAPS 1:1 и 1:4 по 10 минут при 50°C, 2 раза по 20 минут в 2xSSC/0.3% CHAPS при 37°C. После инкубировали с 20 мкг/мл РНКазы в 2xSSC/0.3% CHAPS при 37°C 20 минут, в 2xSSC/ 0.3% CHAPS 10 минут на RT, в 0.2xSSC/0.3% CHAPS 2 раза по 30 минут при 50°C, PBS-0.05% Tween 20/0.3% CHAPS 2 раза по 10 минут при 50C, в PBS-0.25% Triton X-100 10 минут, в PBS-0.05% Tween 20 2 раза по 5 минут.

### *Трансмиссионная электронная микроскопия*

Фолликулы после *in situ* гибридизации с зондом против *germes*, заключали в эпонувую смесь. Изготавливали ультратонкие срезы, которые затем окрашивали антителами против дигоксигенина, содержащими коллоидное золото, проводили согласно протоколу, опубликованному ранее (Bilinski et al, 2010). Затем образцы контрастировали цитратом свинца 15 минут. Ультратонкие срезы анализировали при помощи трансмиссионного микроскопа JEM-1011 и фотографировали на цифровую фотокамеру Gatan ES500W Model 782 (Лаборатория электронной микроскопии, Центр коллективного пользования МГУ им. М.В. Ломоносова).

### *Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)*

Ооциты V-VI стадии со снятыми разными способами оболочками или интактные фолликулы фиксировали в 2.5% глутаральдегиде на 0.1 M какодилатном буфере pH 7.3. Перед исследованием на сканирующем электронном микроскопе образцы промывали по 5 мин. 3 раза в какодилатном буфере, затем фиксировали в течение часа в 1% OsO<sub>4</sub>, и еще раз отмывали 3 раза по 15 мин в буфере. Фиксированные ооциты хранили в новой аликвоте буфера ночь при +4°C. В день сеанса образцы обезвоживали посменной проводкой в спиртах с возрастающей концентрацией (50%, 70% 96%) по 10 минут до ацетона по 5 минут (96% спирт: ацетон (1:1), 100% ацетон). Затем образцы лиофилизировали методом сушки в критической точке. Высушенные ооциты монтировали на столик и напыляли золото с платиной. Затем образцы анализировали на сканирующем электронном микроскопе CamScan S-2 и фотографировали (Лаборатория электронной микроскопии, Центр коллективного пользования МГУ им. М.В. Ломоносова).

### *Работа с белками.*

#### *Анализ специфичности антител*

Фолликулы больших стадий роста (V-VI) получали от лягушек-самок *X. laevis* хирургическим путем. Из кусочка яичника отбирали с помощью пинцетов ооциты большого роста. В растворе MMR Ca-free с коллагеназой инкубировали фолликулы 2 часа с покачиванием для удаления всех оболочек. «Раздетые»

ооциты использовали для экспрессии рекомбинантных меченых белков: His-Germes, Myc-Germes и GFP-Germes. Для этого соответствующие РНК, синтезированные *in vitro*, инъецировали с помощью NanoJect II Drummond. Далее ооциты инкубировали в среде Лейбович 2-3 дня.

Для эксперимента с оценкой стабильности белка в зрелые ооциты VI стадии была инъецирована мРНК GFP-Germes и GFP, синтезированная *in vitro*. В среду для ооцитов добавляли циклогексимид в концентрации 100мг/мл. Через два часа синтез белка полностью блокируется. С помощью конфокальной микроскопии через 2, 4, 6, 24 часа определяли спустя какое время флуоресценция падает вдвое и полностью исчезает.

#### *Электрофорез белков в ПААГ*

Белки разделяются в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях, как было описано ранее (Sambrook, Russell, 2001). Гель заливается между двумя стеклами и полимеризуется, сначала готовится разрешающий гель, затем концентрирующий. В верхнем белки концентрируются из лунки в единый фронт, а в нижнем белки разделяются согласно их массе. Концентрацию акриламида выбирали, в зависимости от массы целевого белка (10 - 15%).

Для экспериментов по индукции экзогенного растворимого белка Germes после электрофореза проводили окрашивание геля раствором кумасси G-250. Предварительно белки фиксировали в геле 40% этанолом 40 минут. Отмывку кумасси производили 10% уксусной кислотой, пока гель снова не становился почти прозрачным.

#### *Иммуноблоттинг*

После ПААГ электрофореза осуществляли перенос белков на PVDF мембрану в 5X трис-глициновом буфере в течение 1 часа. После переноса мембрану блокировали 1 ч в буфере PBST, содержащем 2 % обезжиренное сухое молоко (Урюпинский молочный комбинат), после чего, в растворе того же состава в течение также часа проводили инкубацию с первичными антителами (табл. 2). Мембрану промывали 3 раза по 10 - 15 мин в 15 - 20 мл PBS. Инкубацию со вторичными антителами проводили 45 мин. в PBST с добавлением 2% сухого

молока. Отмывки проводили в тех же условиях, что и после первичных антител. Детекцию осуществляли с помощью набора ECL (Amersham), согласно рекомендациям производителя с использованием ChemiDoc Bio Rad, а интенсивность количественно измеряли с помощью программного обеспечения Image Lab Bio Rad.

### *Конфокальная микроскопия*

Для иммуногистохимического анализа связки ооцитов разных стадий фиксировали в смеси метанол/1% формальдегид при  $-20^{\circ}\text{C}$  2 ч. Образцы нагревали до комнатной температуры, а затем последовательно переводили в раствор PBS по 30 минут каждый шаг (70% метанол:30% PBS, 30% метанол:70% PBS) и обрабатывали 0.25% Triton X-100 30 минут, столько же отмывали раствором PBS при  $+4^{\circ}\text{C}$ . Затем приступали к иммуноокрашиванию. Блокировали 1% бычьего сывороточного альбумина на PBS 20 минут, инкубировали с первичными антителами ночь при  $+4^{\circ}\text{C}$ , а затем отмывали 3 раза по 30 минут раствором PBS- 0.02% Triton X-100. Все выполняли при медленном покачивании образцов. Окраску вторичными флуоресцентными антителами и отмывку проводили также, как с первичными. Анализ окрашенных образцов проводили с помощью конфокального микроскопа Leica SP5 или Olympus FluoView FV10i. Для достоверности, что между вторичными флуоресцентными антителами нет кросс-реакции, параллельно проводили иммуноокрашивание, при котором в ходе эксперимента исключали стадию мечения первичными антителами.

Для визуализации ППК эмбрионы *X. laevis* 29–31 стадий фиксировали в 4% параформальдегиде на PBS при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение ночи. Затем образцы переносили в 0.1% раствор TPBS на 20 мин (PBS-Tween-20), обрабатывали 0.25% Triton X-100 на PBS 30 мин., промывали 3 раза раствором TPBS и инкубировали в блокирующем буфере, содержащем 10% козью сыворотку на TPBS, при RT 2 ч. Далее эмбрионы инкубировали с первичными антителами в блокирующем буфере при  $4^{\circ}\text{C}$  4 дня, промывали буфером TPBS 5 раз и инкубировали с вторичными антителами в блокирующем буфере при  $4^{\circ}\text{C}$  ночь. Антитела отмывали раствором

TPBS 5 раз. Визуализацию проводили с помощью конфокального микроскопа Olympus FluoView FV10i.

Таблица 2. Антитела, использованные в иммунологических методах

<i>Антитела, производитель</i>	<i>Рабочее разведение</i>
Goat anti-rabbit 488 (18772 Sigma-Aldrich)	1 : 200
Donkey anti-sheep594 (SAB4600101 Sigma-Aldrich)	1 : 200
Mouse anti-Actin (ab11003 Abcam)	1 : 3000
anti-digoxigenin nanogold labeled	1 : 30
Anti-digoxigenin antibody HRP (ab119345 Abcam)	1:1000
Mouse anti-GapDH (ab8245 Abcam)	1 : 5000
anti-Germes, полученные в этой работе	1 : 1500
anti-Xpat (получены в лаб. HR Woodland)	1 : 100
Cy2 donkey anti-rabbit (AB_2340612 Jackson ImmunoResearch)	1 : 100
Cy5 donkey anti-mouse (AB_2340820 Jackson ImmunoResearch)	1 : 100
HRP goat anti-mouse (AB_2338512 Jackson ImmunoResearch)	1 : 50000
HRP goat anti-rabbit (AB_2307391 Jackson ImmunoResearch)	1 : 10000
Mouse anti-His (ab5000 Abcam)	1:1000
Rabbit anti-MT (MABS2047M Sigma)	1:2500
Rabbit anti-GFP (ab290 Abcam)	1:1000

#### *Сравнение и поиск нуклеотидных последовательностей*

Поиск нуклеотидных последовательностей транскриптов и белков проводили в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Последовательности сравнивали и выравнивали с помощью программы NCBI BLAST 2 с использованием алгоритма discontinuous megablast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Stephen et al., 1997) и Clustal Omega 3

(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Секвенированные последовательности полученных ампликонов сравнивали с нуклеотидными и белковыми последовательностями *X. laevis* в NCBI BLAST.

Филогенетическое дерево бесхвостых амфибий было построено вручную на основе филогении семейств, представленной на онлайн-ресурсе [amphibiaweb.org](http://amphibiaweb.org) ([https://amphibiaweb.org/taxonomy/AW\\_FamilyPhylogeny.html](https://amphibiaweb.org/taxonomy/AW_FamilyPhylogeny.html)). Для построения дерева использовали лишь виды, геномы которых доступны в базе NCBI и были проанализированы на наличие *germes*.

#### *Анализ структуры белка*

Последовательность белка анализировали при помощи программного обеспечения [predictprotein.org](http://predictprotein.org), с помощью которого были предсказаны вторичные структуры и сайты модификации аминокислотных остатков. Программой [alphafold.ebi.ac.uk](http://alphafold.ebi.ac.uk) была предсказана третичная структура белка *Germes*.

#### *Статистический анализ*

Все экспериментальные процедуры были выполнены как минимум в трех-пяти повторностях. Для статистического анализа использовали программный пакет GraphPad Prism Version 7.04 (GraphPad Software, США). Для сравнения результатов использовали непараметрические U критерий Манна–Уитни или критерию Крускала-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. Различия считали значимыми для  $p < 0,05$ .

## 4 РЕЗУЛЬТАТЫ

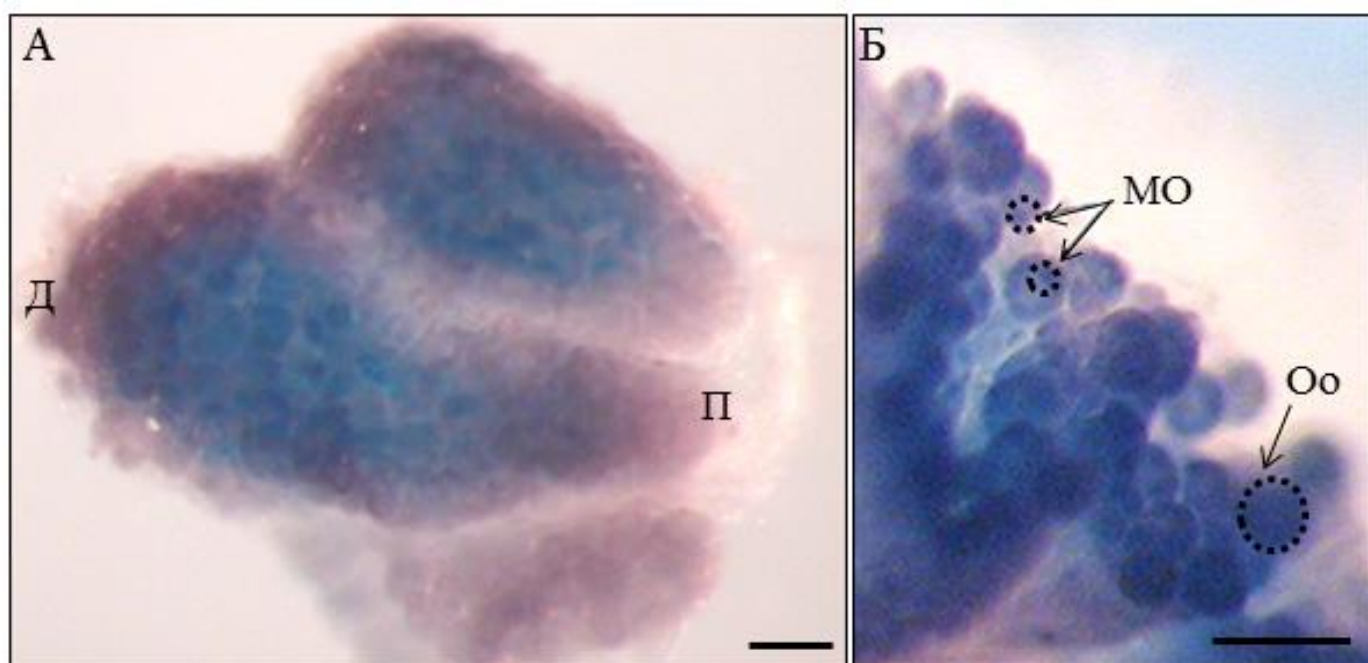
### 4.1 Сопоставление содержания РНК и белка *Germes* в оогенезе и раннем развитии

При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: **Konduktorova V.V.**, Luchinskaya N.N. Follicular cells of the amphibian ovary: Origin, structure, and functions // Russian Journal of Developmental Biology. – 2013. – V. 44. – N. 4. – P. 232–244; Ponomarev M. B., **Konduktorova V.V.**, Luchinskaya N. N., Belyavsky A. V. Localization of *Germes* RNA in *Xenopus* Oocytes // Russian Journal of Developmental Biology. – 2021. – V. 52. – N.1. – P. 1–8; **Konduktorova V.V.**, Luchinskaya N.N., Belyavsky A.V. Expression of the *germes* germ plasm gene in follicular cells of *X. laevis* oocytes // Russian Journal of Developmental Biology. – 2022. – V. 53. – N. 5. – P. 350–362; **Konduktorova V.V.**, Fofanova. E. G., Nikishin D. N. The Distribution of the Germ Plasm Gene *germes* among Anurans // Russian Journal of Developmental Biology. Bio. – 2023. – V. 54. – N. 6. – P. 384–388.

Одной из задач данной работы было оценить динамику содержания и пространственное распределение в ооцитах и ранних эмбрионах РНК *germes* и кодируемого белка *Germes*. Методом хромогенной гибридизации *in situ* с зондом против мРНК *germes* проведен анализ распределения транскриптов этого гена в гонадах самок *X. laevis* вскоре после метаморфоза (стадии 65–66). К этой стадии яичники уже хорошо сформированы, имеют дольчатую структуру и содержат ооциты на разных стадиях оогенеза. В дистальной части яичника находятся более зрелые ооциты, тогда как в проксимальной области еще видны оогонии. Транскрипт *germes* выявляется в яичнике, формируя проксимально-дистальный градиент распределения в ооцитах I-II порядка (рис. 4). Оогонии не окрашиваются зондом против *germes* (их бледно-розовая окраска является фоновой). Экспрессия



РНК *germes* начинает выявляться с самого раннего этапа оогенеза, начиная с I стадии развития ооцита. При этом интенсивность окрашивания, а, следовательно и количество мРНК *germes* увеличивается с ростом ооцита. Значительно меняется также и локализация транскриптов *germes* в ооцитах по мере созревания. На стадиях I-II транскрипт распределен диффузно по всему объёму цитоплазмы. Затем большая часть мРНК на стадии II-III локализуется в центральной области ооцита, соответствующей положению митохондриального облака (МО) (рис. 4Б). Небольшое количество мРНК сохраняет равномерное распределение по всему объёму цитоплазмы на этих стадиях.

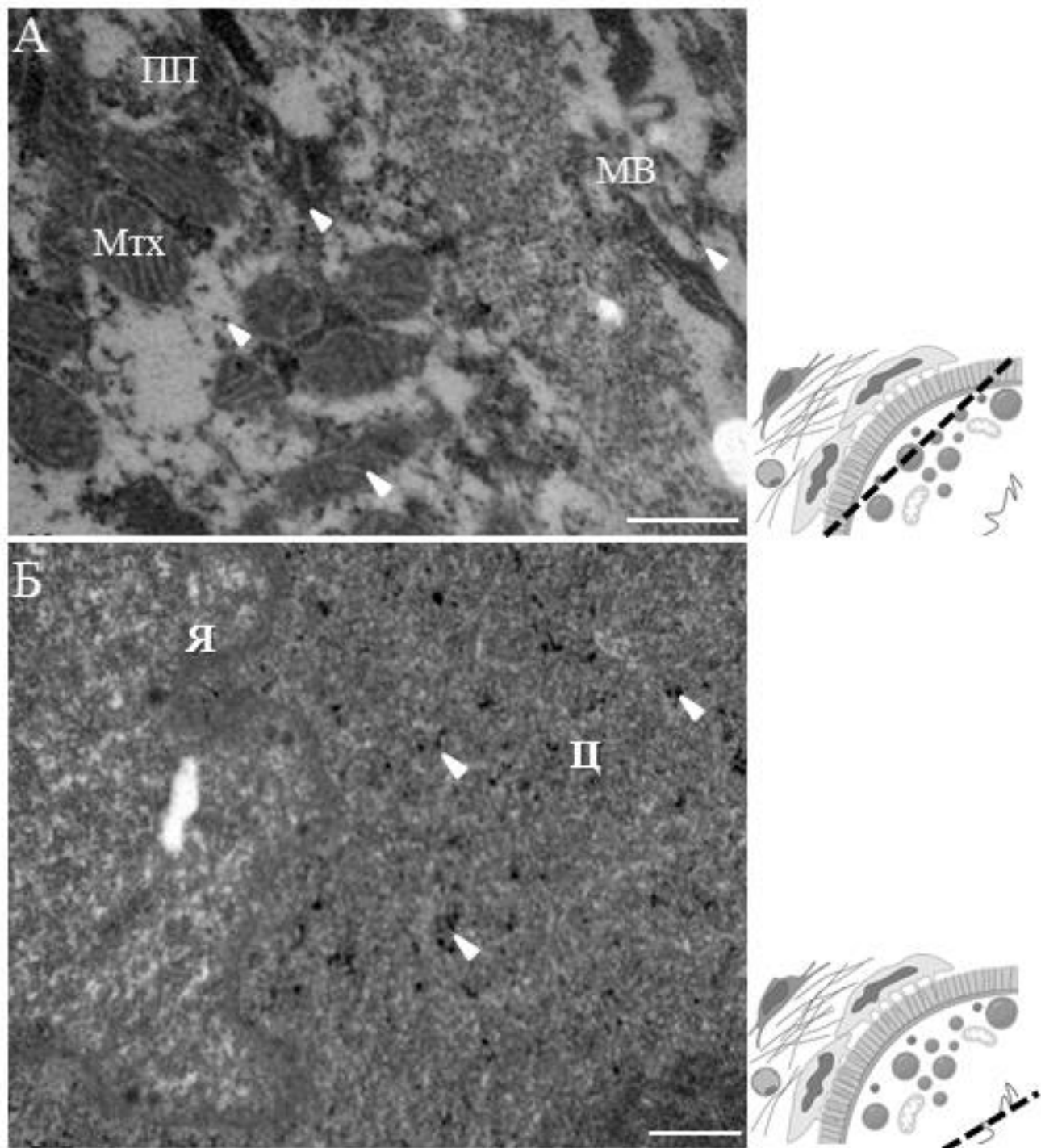


**Рисунок 4.** Экспрессия мРНК *germes* в яичнике шпорцевой лягушки *X. laevis* стадии 66 (конец метаморфоза), выявленная с помощью хромогенной гибридизации *in situ*.

Оо – ооциты, П – проксимальная часть яичника, Д – дистальная часть яичника. (А, Б) Дольки яичника. В проксимальной части экспрессия мРНК *germes* отсутствует, в дистальной части видно начало локализации диффузно распределенной мРНК в митохондриальное облако (МО). Масштабный отрезок: 1000 мкм.

Внутриклеточное распределение мРНК *germes* в ооцитах проанализировано с использованием *in situ* гибридизации с окраской ультратонких срезов антителами, мечеными наночастицами золота (рис. 5). Золотая метка выявлена по всему объёму малых ооцитов стадии II, в том числе в околоядерной области (Рис. 5. б). Кроме того, экспрессия мРНК *germes* выявлена на вегетативном

полюсе ооцитов большого роста в составе ПП. Частицы золота располагаются в большой плотности и в значительном количестве вокруг митохондрий непосредственно в кортикальной области вегетативного полюса (рис. 5А).



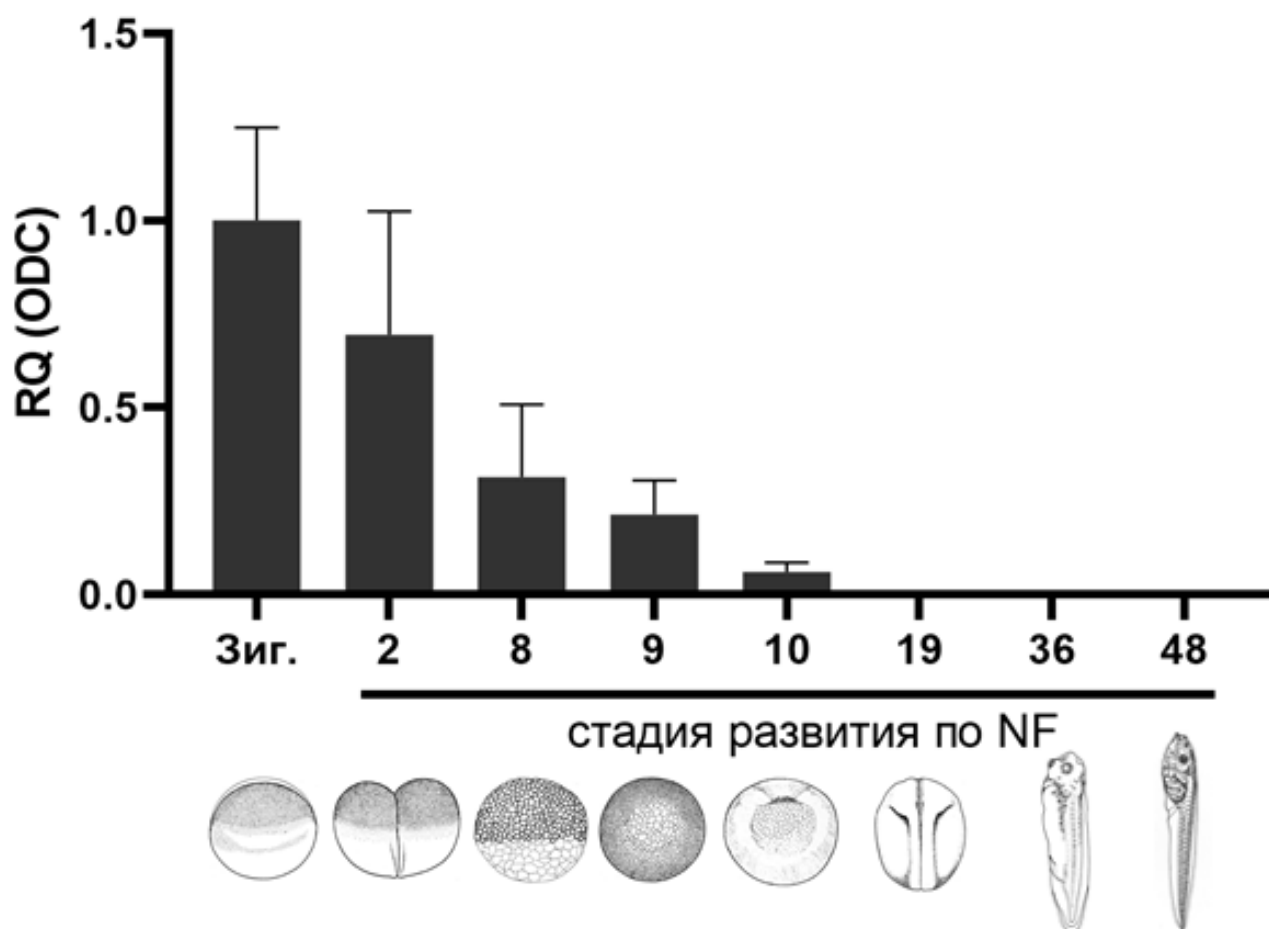
**Рисунок 5.** Гибридизация *in situ* с зондом к мРНК *germes* с окраской ультратонких срезов антителами, меченными наночастицами золота (указаны стрелками).

(А) Транскрипт-Аи – в половой плазме (ПП) и макровиллях (МВ) вегетативного полюса ооцита стадии VI. Мтх- митохондрии. (Б) Транскрипт-Аи в околядерной цитоплазме малого ооцита стадии II в процессе формирования митохондриального облака. Я – ядро, Ц –

цитоплазма. Масштабный отрезок: 0.5 мкм. Пунктирной линией на схеме обозначена плоскость среза.

Анализ динамики экспрессии мРНК *germes* в ходе раннего эмбриогенеза, выполненный методом ПЦР в реальном времени, показал, что после оплодотворения, начиная с первых часов развития и до стадии гаструлы, содержание транскрипта в зародышах плавно снижается (рис. 6). Экспрессия мРНК *germes* максимальна на стадии зиготы (уровень экспрессии принят за 100%), после чего постепенно уменьшается к стадии нейрулы. На стадии двух бластомеров уровень экспрессии (RQ) относительно гена домашнего хозяйства ODC, нормированный на стадию зиготы, составляет 69,4%, на стадиях средней бластулы – 31,4%, поздней бластулы – 21,5%, ранней гаструлы – 6,1%, нейрулы – 0,08%. На стадии нейрулы (ст. 19) материнский транскрипт не детектируется и далее не выявляется вплоть до головастика. Таким образом, мРНК *germes* значительно накапливается и активно изменяет локализацию в течение оогенеза, а после оплодотворения в ходе эмбрионального развития ее содержание постепенно снижается, полностью исчезая к стадии нейрулы.

## Germes мРНК



**Рисунок 6.** Динамика экспрессии мРНК *germes* в ходе эмбрионального развития *X. laevis*.

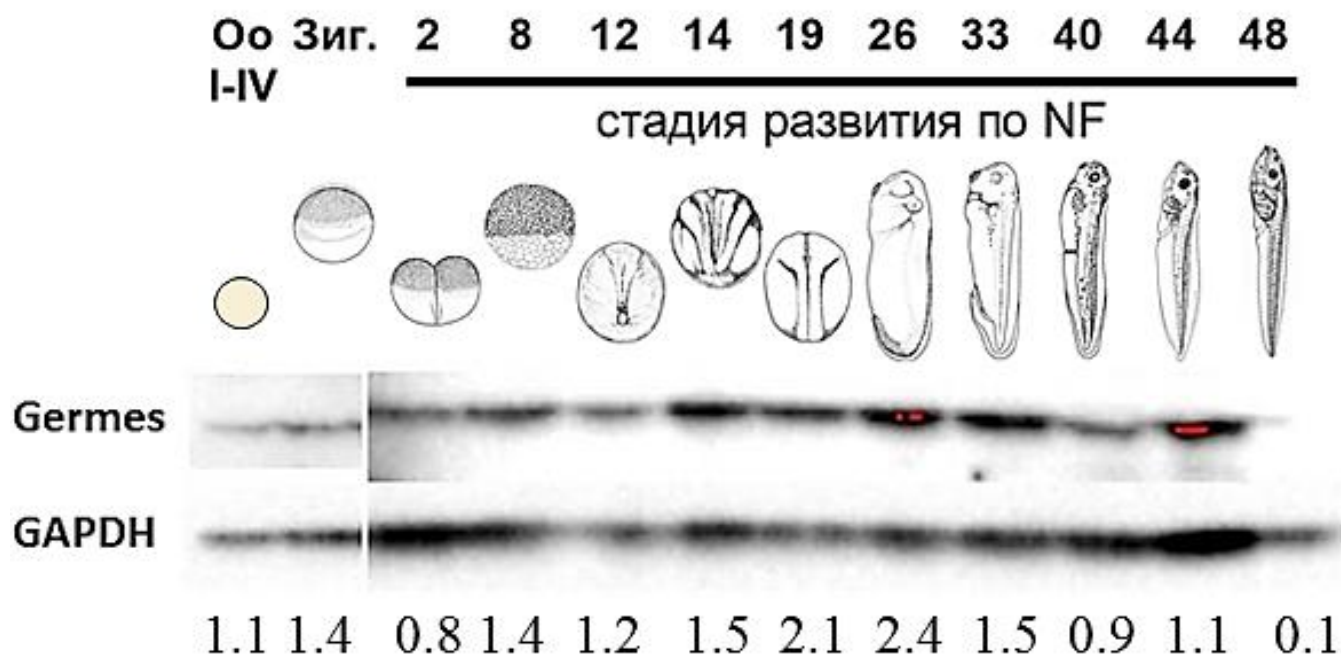
Значения относительных уровней экспрессии (RQ) получены методом ОТ-ПЦР в реальном времени и рассчитывались методом  $\Delta\Delta C_t$ . В качестве референсного гена использовали *odc*. Экспрессия в зиготе принята за 1. Зиг. – зигота; стадии эмбрионального развития отобраны согласно таблицам Nieuwkoop-Faber, 1956.

Для изучения белкового профиля в процессе оогенеза и раннего развития шпорцевой лягушки критически важно иметь в наличии специфические антитела против белка Germes. Такие антитела в настоящее время отсутствуют на открытом рынке, что вынудило получить необходимые для работы антитела самостоятельно (см. раздел Материалы и методы). Применение полученных поликлональных кроличьих антител и методики Вестерн-блоттинга позволило идентифицировать белок Germes в ооцитах и эмбрионах на разных стадиях развития и проанализировать динамику его содержания (рис. 7).

Проведен анализ содержания белка Germes в ходе оогенеза. Маленькие прозрачные ооциты ранних стадий роста (I-II) и начала вителлогенеза (III-IV) выделены из яичников лягушат в возрасте 5-6 мес. после метаморфоза, а зрелые полноразмерные ооциты V-VI стадии – из взрослых половозрелых лягушек. Анализ содержания белка Germes методом Вестерн-блоттинга показал, что на ранних этапах оогенеза (стадии I-IV) белок Germes содержится в том же количестве, что и в зрелых ооцитах на стадии VI (рис. 7).

С помощью полученных антител и метода Вестерн-блоттинга определено наличие и динамика содержания белка в ходе эмбрионального развития. После стимуляции самок и оплодотворения *in vitro* для получения лизатов были отобраны основные стадии раннего развития: зигота, дробление (стадии 2, 8), гастрюляция (стадия 12), нейруляция (стадии 14, 19), хвостовая почка (стадии 26, 33), головастика (стадии 40, 44, 48). Анализ содержания белка Germes относительно гена домашнего хозяйства GAPDH показал, что белок остается на одном уровне в зиготе, в период дробления, гастрюляции и нейруляции (рис. 7). Значения интенсивности полос Germes, нормированных на GAPDH, относительно стадии зиготы, принятой за 100% составляют: Оо I-IV – 110%, 2 бластомера – 70,6%, средняя бластула – 143%, гастрюла – 123%, ранняя нейрула – 151 %, средняя нейрула – 214%, ранняя хвостовая почка – 237%, поздняя хвостовая почка – 153%, головастик (стадия 40) – 92%, головастик (стадия 44) – 110%, головастик (стадия 48) – 7%. Наблюдаемые колебания значений содержания белка Germes от стадии к стадии объясняется различным количеством формирующихся половых клеток в каждом отдельно взятом организме (20-50 шт.). Далее наблюдается плавное снижение количества белка Germes в зародышах вплоть до последней исследованной нами стадии 48, на которой, тем не менее, он не исчезает полностью. Можно заключить, что белок, как и РНК, присутствует в весомом количестве, как весь период оогенеза, так и в эмбриональном периоде вплоть до стадии нейрулы, после чего его содержание постепенно снижается, достигая минимума на стадии 48. Отметим, что присутствие белка Germes в

раннем развитии наблюдается гораздо дольше, по сравнению с быстро деградирующей после оплодотворения мРНК.



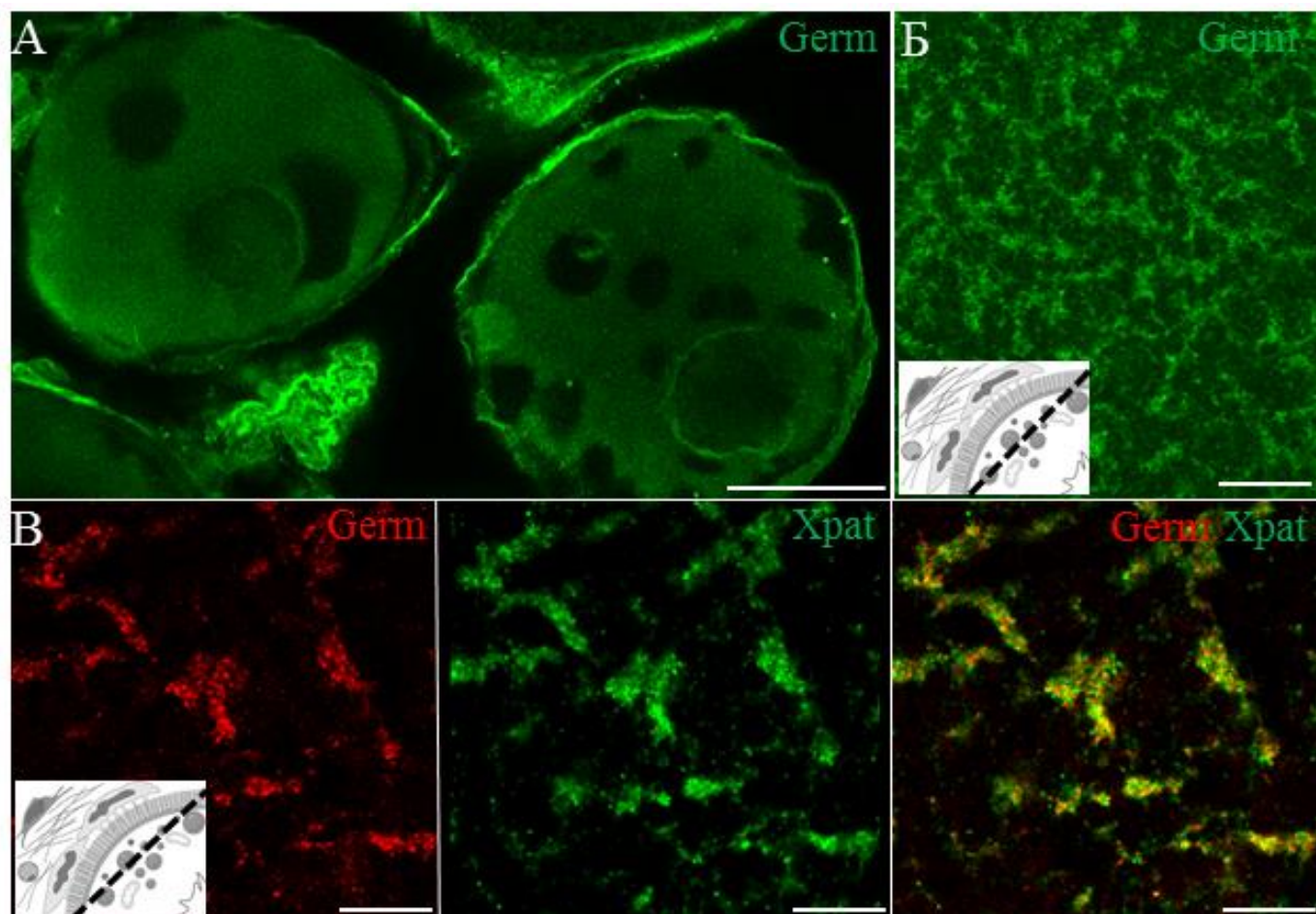
**Рисунок 7.** Анализ содержания белка Germes в ооцитах и эмбрионах *X. laevis*.

Методом Вестерн-блота. Уровень содержания Germes (ось Y на графиках) нормирован на экспрессию гена домашнего хозяйства GAPDH. Оо I-IV – ооциты стадий I–IV со всеми оболочками, Зиг – неоплодотворенные ооциты VI стадии; 2–48 – стадии развития по Nieuwkoop и Faber. Белку Germes соответствует полоса около 70 кДа.

С помощью полученных антител удалось оценить не только наличие белка в развитии, но и выяснить его локализацию. Используя иммуоцитохимическое окрашивание, был проанализирован паттерн локализации белка Germes в ооцитах. Для окрашивания были взяты целые фолликулы разных стадий. На I–II стадиях ооцитарного роста белок имел диффузное распределение по всему объёму ооцита, а к IV стадии локализовался в островках половой плазмы на вегетативном полюсе, также как и РНК-транскрипт (рис. 8). Окрашивание ооцитов стадий большого роста (V–VI) антителами против Germes также выявило характерные островки ПП. Причем, если провести параллельное иммуоокрашивание фолликулов антителами против другого маркера ПП Храт, то наблюдается колокализация белков в островках ПП (рис. 8В). Визуализация белка иммуоцитохимическим методом подтверждает, что белок начинает



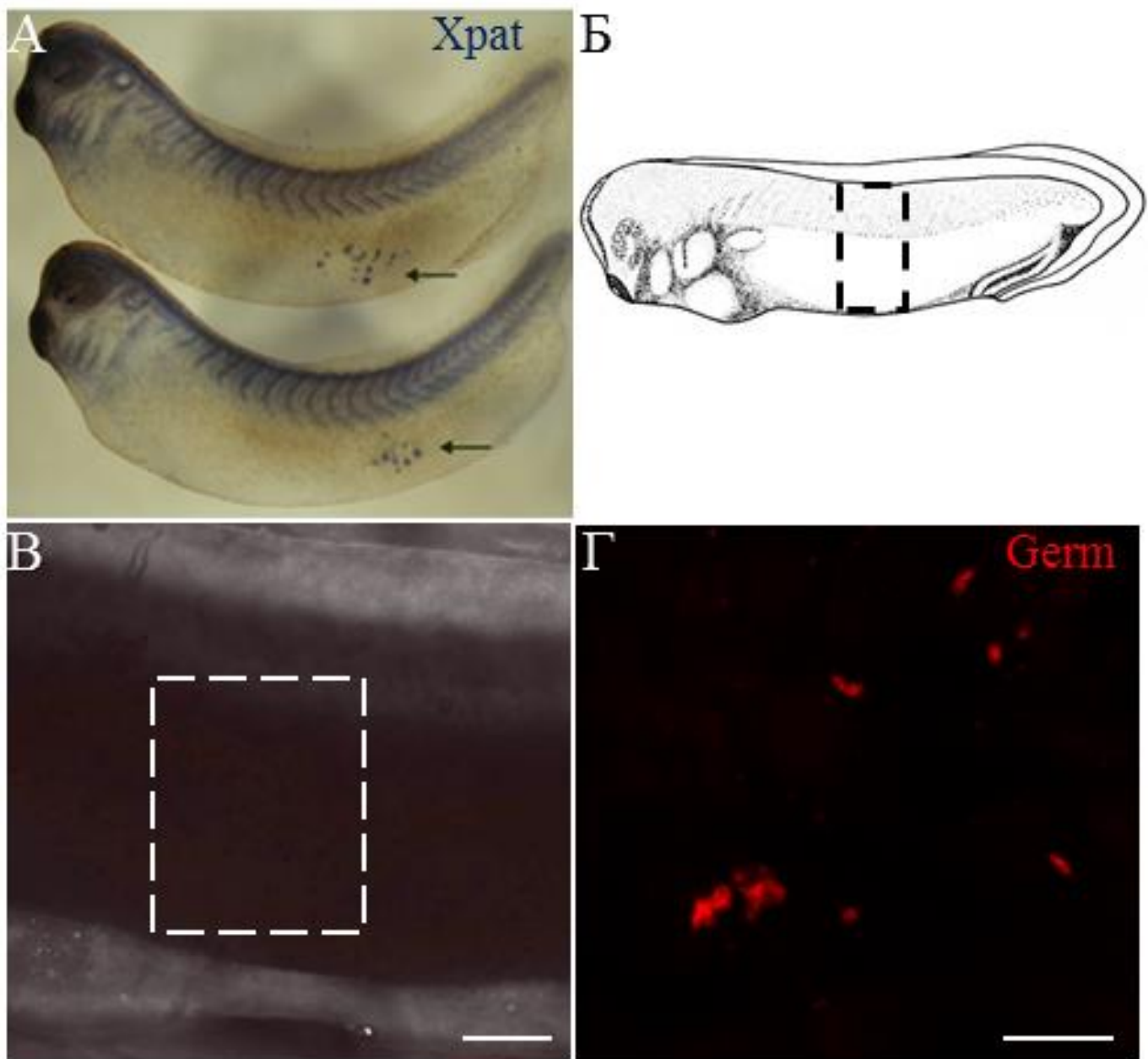
транслироваться сразу с началом малого роста ооцитов и сохраняется весь оогенез.



**Рисунок 8.** Иммуноокрашивание на белок Germes ооцитов.

(А) Ооцит ст. I окрашен равномерно; (Б) Ооцит ст. VI. Белок локализован в островках ПП вегетативного полюса. (В) Ооцит ст. VI. Белок Germes локализован в островках ПП вегетативного полюса. Иммуноокрашивание на Xpat (красный), Germes (зеленый), колокализация (желтый). Масштабные отрезки: А, Б 25 мкм, В 10 мкм. Пунктирной линией на схеме обозначена плоскость среза.

Иммуноокрашивание эмбрионов на стадии хвостовой почки (29–32) против белка Germes выявляет группу клеток на боковой поверхности зародышей (рисунок 9 Г, Д). Кластер окрашенных клеток схож с таким же, выявляемым с помощью хромогенной гибридизации *in situ* с зондом к РНК-маркеру половой плазмы *xpat*, мРНК которого еще сохраняется на стадии миграции ППК в гонаду (рис. 9А).



**Рисунок 9.** Иммуноокрашивание на белок Germes зародышей в период миграции первичных половых клеток.

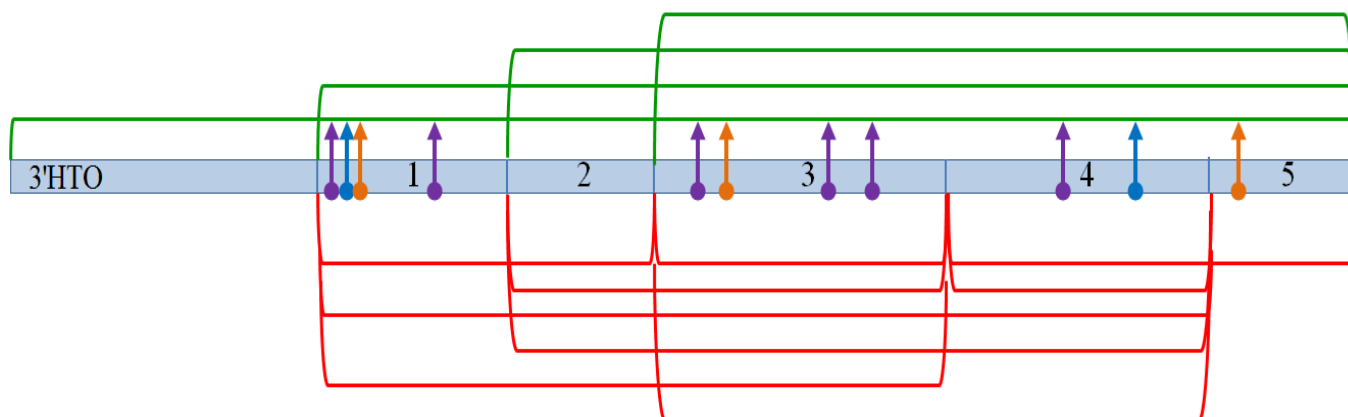
(А) ППК зародыша на стадии 32, выявленные путем *in situ* гибридизации с зондом к Xpat (указаны стрелками). (Б) Схематическое изображение зародыша ст. 30, рамкой отмечена зона миграции ППК. (В). Бок зародыша на стадии 30, рамкой отмечена зона, представленная на рис. (д) (фазовый контраст). (Г) Иммуноокрашивание на белок Germes выявляет группу мигрирующих первичных половых клеток (z-stack). Масштабные отрезки: В 10 мкм, Г 15 мкм.

Результаты иммуноцитохимического анализа зародышей свидетельствуют, что белок Germes меняет свое распределение на этой стадии развития и сохраняется только в мигрирующих ППК. Это также согласуется с предыдущим выводом о наличии белка на стадиях хвостовой почки *X. laevis* во время миграции ППК для последующего заселения ими половых валиков.



## 4.2 Структурный анализ последовательности РНК и белка *Germes*

Из данных литературы известно, что за локализацию РНК в МО на I-II стадии оогенеза чаще отвечает 3' нетранслируемая область (НТО) РНК. Поэтому последовательность 3'НТО РНК *germes* была исследована на предмет наличия известных мотивов, необходимых для доставки в определенные компартменты клетки или специфического связывания с другими белками. Детальный анализ 3'НТО РНК с помощью программы REPFIND выявил повторы из тринадцати САС мотивов отдельно и в различных сочетаниях с другими нуклеотидами (САСТ, САСТТТ, САСТТ, САСТГ) (рис. 10), благодаря которым, вероятно, РНК *germes* может концентрироваться и входить в состав МО. При этом «плотность» САС повторов выше на 3' конце 3'НТО. Так их найдено 15, в отличие от остальной последовательности 3'НТО РНК, где их всего 6.



**Рисунок 10.** Схема последовательности: 3'НТО *germes* 799 п.о. разбита на фрагменты на основании вторичной структуры. Красными рамками выделены фрагменты не способные локализоваться в МО ооцита стадии I/II, зелеными – локализующиеся. Цветными стрелочками отмечены мотивы VM1 (синий), E2(сиреневый) и MCLC (оранжевый).

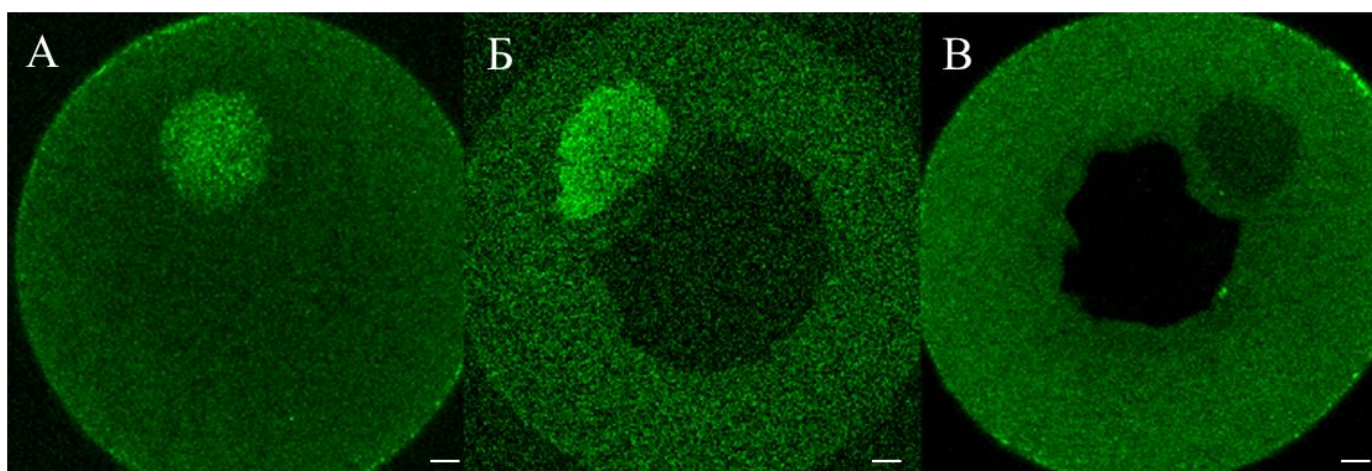
В последовательности 3'НТО были обнаружены мотивы MCLC, VM1 и E2. Мотив UGCAC необходим для локализации в МО (MCLC). Второй, обнаруженный в 3'НТО *germes*, мотив E2 может иметь несколько нуклеотидных последовательностей WYCAC: UUCAC, AUCAC, ACCAC и UCCAC. Также в 3'НТО *germes* найдена последовательность мотива, названного Vg1 Motif 1 - VM1(YUUCU): UUUCU, CUUCU, UCUCU. Он участвует во взаимодействии с

белками Vg1RBP/Vera/Igf2bp3 и hnRNPI/VgRBP60/Ptbp1. Показано для многих РНК, что они необходимы для локализации РНК как по раннему, так и по позднему пути. Таким образом, в 3'НТО *germes* были обнаружены мотивы, вероятно, необходимые для локализации, как в МО, так и для направленного транспорта на вегетативный полюс ооцита по позднему пути.

Известно, что РНК может образовывать вторичные и третичные структуры, в том числе и в 3'НТО. Можно предположить, что эти структуры являются важными и необходимыми для транспортировки и локализации РНК. Чтобы это проверить, последовательность 3'НТО была проанализирована программой MFOLD, предсказывающей вторичные структуры РНК. Предсказанная вторичная структура была условно разделена на 5 частей. Все условные части РНК также были сопоставлены с картой коротких повторов САС (Рис. 10).

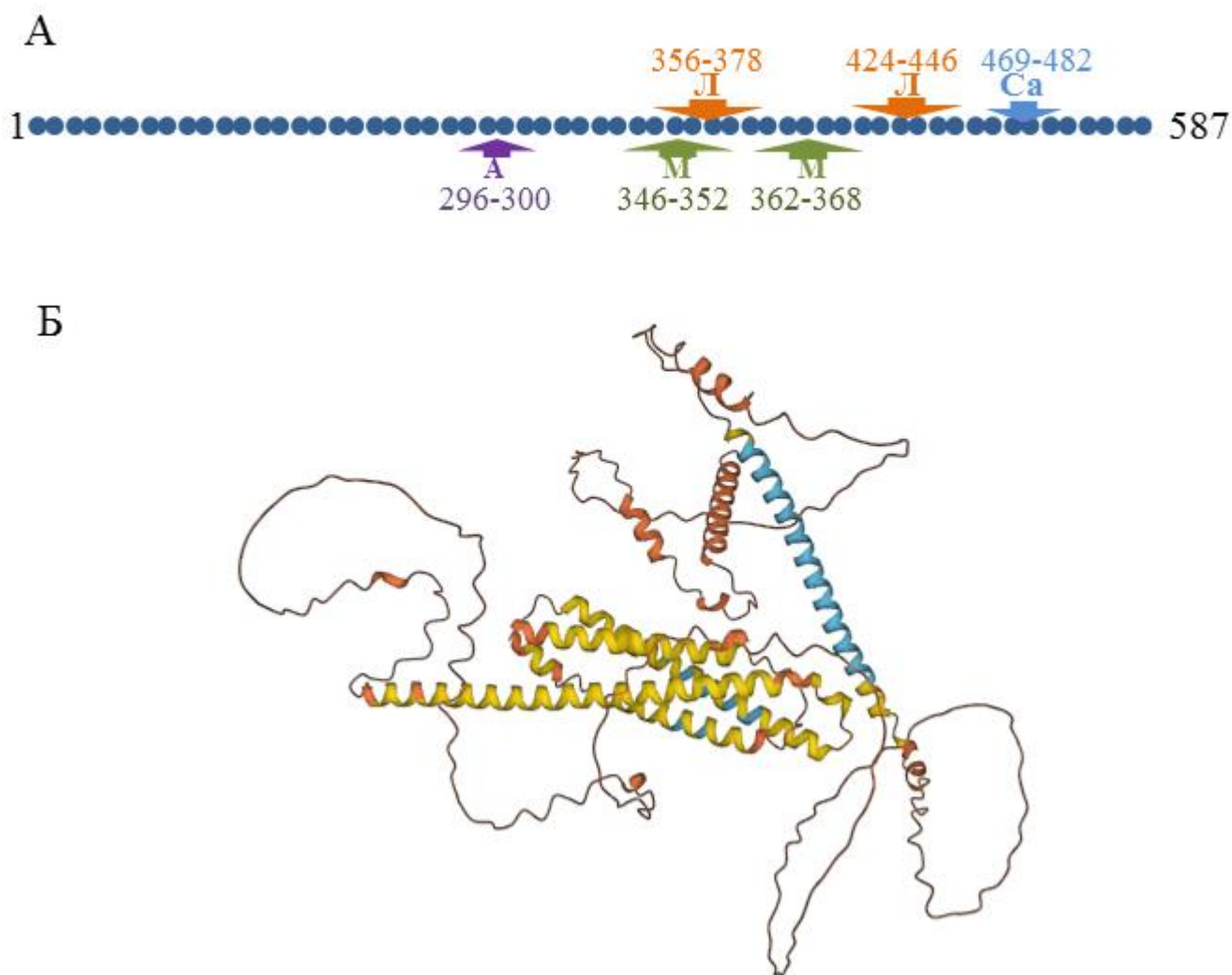
Для того, чтобы выяснить, какие минимальные последовательности 3'НТО являются необходимыми для локализации РНК *germes* в МО, были получены молекулярные конструкторы с последовательностями фрагментов 3'НТО. Инъекции флуоресцентных РНК этих конструкторов в ооциты I/II стадии, синтезированных *in vitro*, позволили проанализировать локализацию в МО. РНК, содержащая все 5 фрагментов, и РНК 1-5, 2-5, 3-5 областей локализуется в МО так же, как и контрольная РНК полной последовательности 3'НТО (Рис. 11). РНК фрагментов 1-2, 2-3, 1-4, 3, 4, 4-5, 2-4, 1-2+4-5, 1-3 и 3-4 не локализовались в МО, а распределялись равномерно по всему объёму цитоплазмы. Стоит отметить, что многие РНК, лишённые последнего короткого фрагмента 5, не обладали способностью к локализации в МО. Можно заключить, что он является важным и необходимым для локализации РНК *germes* в МО. А минимальной последовательностью, которая все еще сохраняет нормальную локализацию, является область 3-5 3'НТО РНК *germes*. Суммируя данные результатов, области 3 и 5 являются наиболее значимыми для локализации РНК. Сопоставив места мотивов на последовательности фрагментов, можно заключить, что часть всех трех находится в последовательности 1 и не являются необходимыми. Однако минимальная локализуемая область 3-5 3'НТО РНК *germes* содержит VM1, E2

и MCLC мотивы. Кроме того, в каждой из двух самых значимых областей (3, 5) присутствует мотив локализации в МО MCLC, с помощью которого РНК локализуется на вегетативный полюс в основном по первому пути. Количество повторов в области 3-5 САС также довольно высокое – 10 из 15 всей последовательности 3'НТО.



**Рисунок 11.** Локализация фрагментов 3'НТО РНК *germes*. РНК участков 2-5 (А) и 3-5 (Б) локализуется в МО. РНК области 4-5 (В) исключается из МО. Масштабный отрезок: 20 мкм.

Белок *Germes* состоит из 587 аминокислот и имеет молекулярный вес 68 кДа. По предсказанным данным имеет  $\alpha$ -спирали 51.1%, прямые участки 7.8% и петли 41.1% (рис. 12). Хотя белок в своем составе имеет две лейциновые молнии (с 356 аминокислоты, LSFRLPIGLFSTTSLLESNDSFL, и с 424 аминокислоты, LQGIEDRLKYTEAILKEEETAL), сигнал ядерной локализации в данном белке не идентифицирован. Т.е. мотивы лейциновых молний, вероятно, играют свою роль лишь в белок-белковых взаимодействиях. Также в белке есть EF-hand кальций-связывающий домен (с 469 аминокислоты, DVNKGNYLQNQDI). Белковая последовательность может фосфорилироваться по нескольким сайтам аминокислот с помощью различных киназ, гликозилироваться и амидироваться. Белок может модифицироваться миристоилтрансферазой (с 346 аминокислоты; GLQECG, с 362 аминокислоты, GLFSTT), что также может свидетельствовать об участии в белок-белковых/ белок-липидных взаимодействиях или участвовать в пути передачи внутриклеточного сигнала.



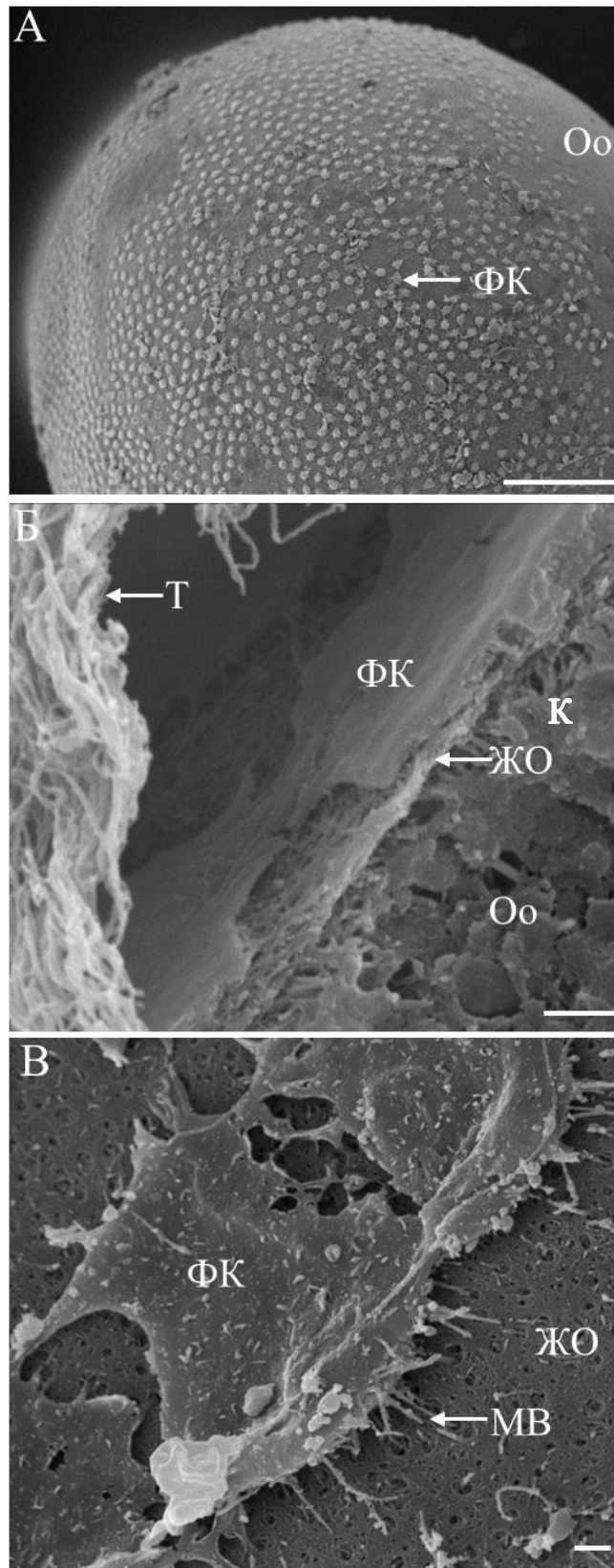
**Рисунок 12.** Структура последовательности белка.

(А) Схематическое изображение первичной последовательности белка, где отмечены сайты амилализации (А), миристоилирования (М), лейциновых застежек-молний (Л), Ca-связывающий EF-hand домен (Ca). (Б) Вторичная и третичная структура последовательности белка *Germes*, предсказанные программой [alphafold.ebi.ac.uk](http://alphafold.ebi.ac.uk). Разными цветами показана степень достоверности относительного положения двух остатков аминокислот в предсказанной структуре, где голубым цветом - высокая степень достоверности (70-90%), желтым - средняя (50-70%) и оранжевым - низкая (меньше 50%).

### 4.3 *Исследование экспрессии germes в фолликулярных клетках*

#### 4.3.1 *Продукты гена germes в фолликулярных клетках ооцита*

Изучая распределение белка *Germes* в ооцитах шпорцевой лягушки, мы обнаружили, что белок также локализуется в фолликулярных клетках как больших, так и малых фолликулов. У шпорцевых лягушек фолликулярные клетки окружают ооциты всех стадий в один слой (рис. 16).



**Рисунок 16.** Сканирующая электронная микроскопия фолликула ст. VI.

(А, В) ооцит с фолликулярными клетками, слой теки снят. Фолликулярные клетки в неблагоприятных условиях сокращены и видны уходящие в желточную оболочку макровилли. (Б) поперечный срез фолликула. Масштабные отрезки: 150 мкм, 1,5 мкм, 1,5 мкм. ФК – фолликулярные клетки, МВ - макровилли (указаны стрелкой), Оо – ооцит, Т – тека, ЖО – желточная оболочка.

Между ооцитом и ФК осуществляется транспорт веществ, для этого формируются макровилли на поверхности, обращенной к ооциту (рис. 16). Они пронизывают желточную оболочку. Ооцит же формирует микровилли, которые посредством щелевых контактов осуществляют взаимодействие с макровиллиями (МВ) (Рис. 1, 9).

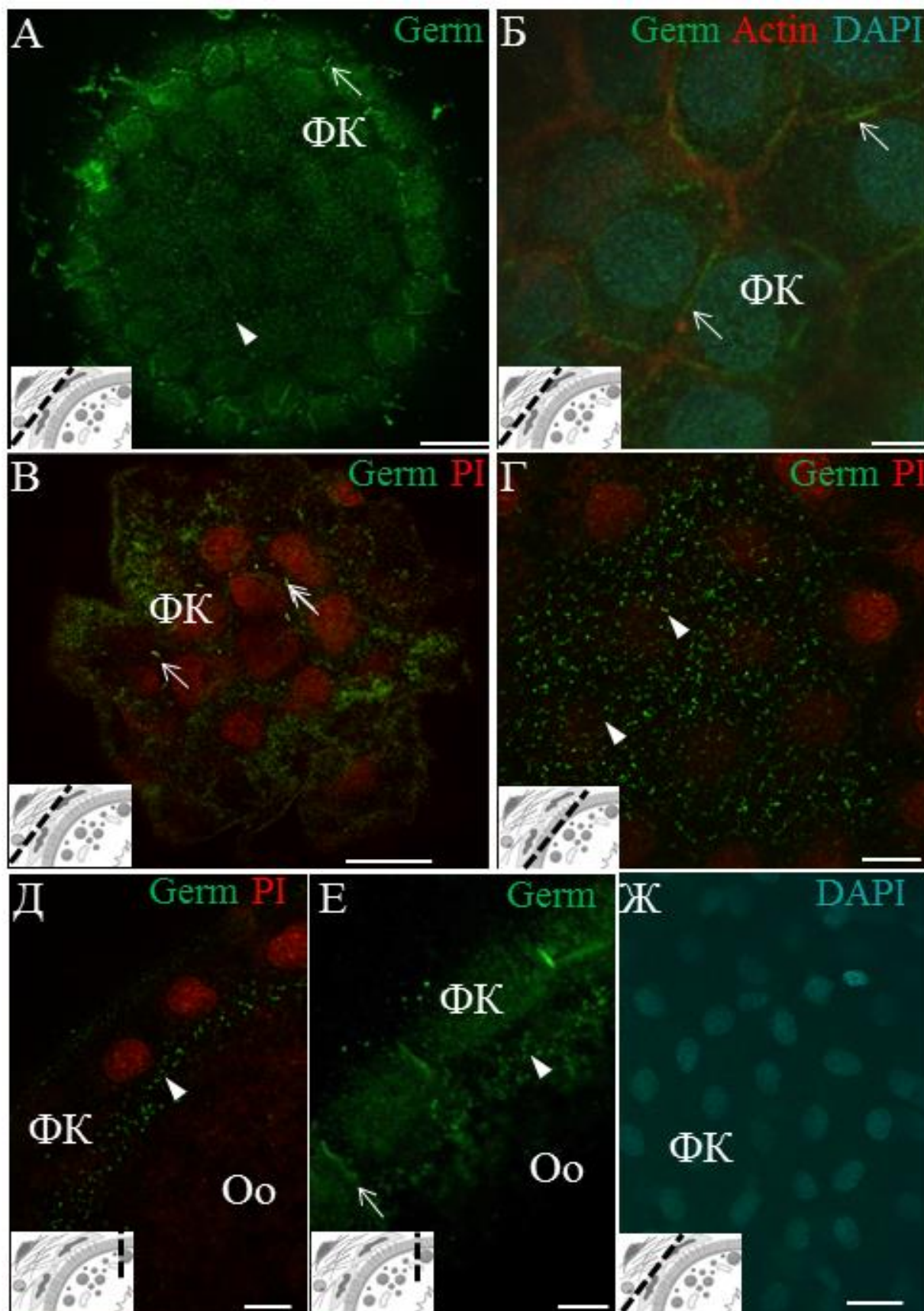
Белок *Germes*, выявленный нашими антителами, визуализируется в ФК в виде линейных структур длиной около 5,5 мкм в контактных зонах и зонах перекрытия соседних ФК. Такие, не описанные ранее структуры, выявлялись в ФК как больших, так и малых ооцитов. Белок *Germes* сходным образом выявляется также в макровиллиях ФК. Поперечный диаметр иммуноокрашенных структур совпадает с диаметром отростков ФК, как они видны в сканирующий микроскоп. Поэтому можно сделать вывод, что белок *Germes* локализован внутри макровиллий. МВ имели 0.3–0.4 мкм в диаметре.

Как уже упоминалось ранее, ФК являются производными эпителия формирующегося яичника, т.е. соматическое происхождение в отличие от ооцитов. Возникает закономерный вопрос происхождения белка *Germes* в этих клетках. Он или его мРНК могут транспортироваться из ооцита с последующей трансляцией в ФК или *germes* экспрессируется в фолликулярном слое самостоятельно.

С помощью полученных антител в ФК был обнаружен белок. Следующей закономерной задачей было исследовать наличие РНК *germes* в ФК. Анализ можно было провести качественный, например, с помощью *in situ* гибридизации, и\или количественный, при помощи ПЦР-РВ. Для качественного анализа использовался метод хромогенной *in situ* гибридизации, при котором определяется локализация гибридизованной РНК при помощи реакции окисления щелочной фосфатазой. О том, что реакция прошла успешно, служило яркое лиловое окрашивание ПП на вегетативном полушарии, в котором содержится большое количество мРНК *germes*. Однако, ввиду малого размера самих фолликулярных клеток и малой толщины этой оболочки (0.7–1 мкм) зрелых фолликулов, голубое окрашивание клеток на парафиновых срезах могло быть



ложно-положительным результатом и не являлось весомым доказательством (рис. 18А).

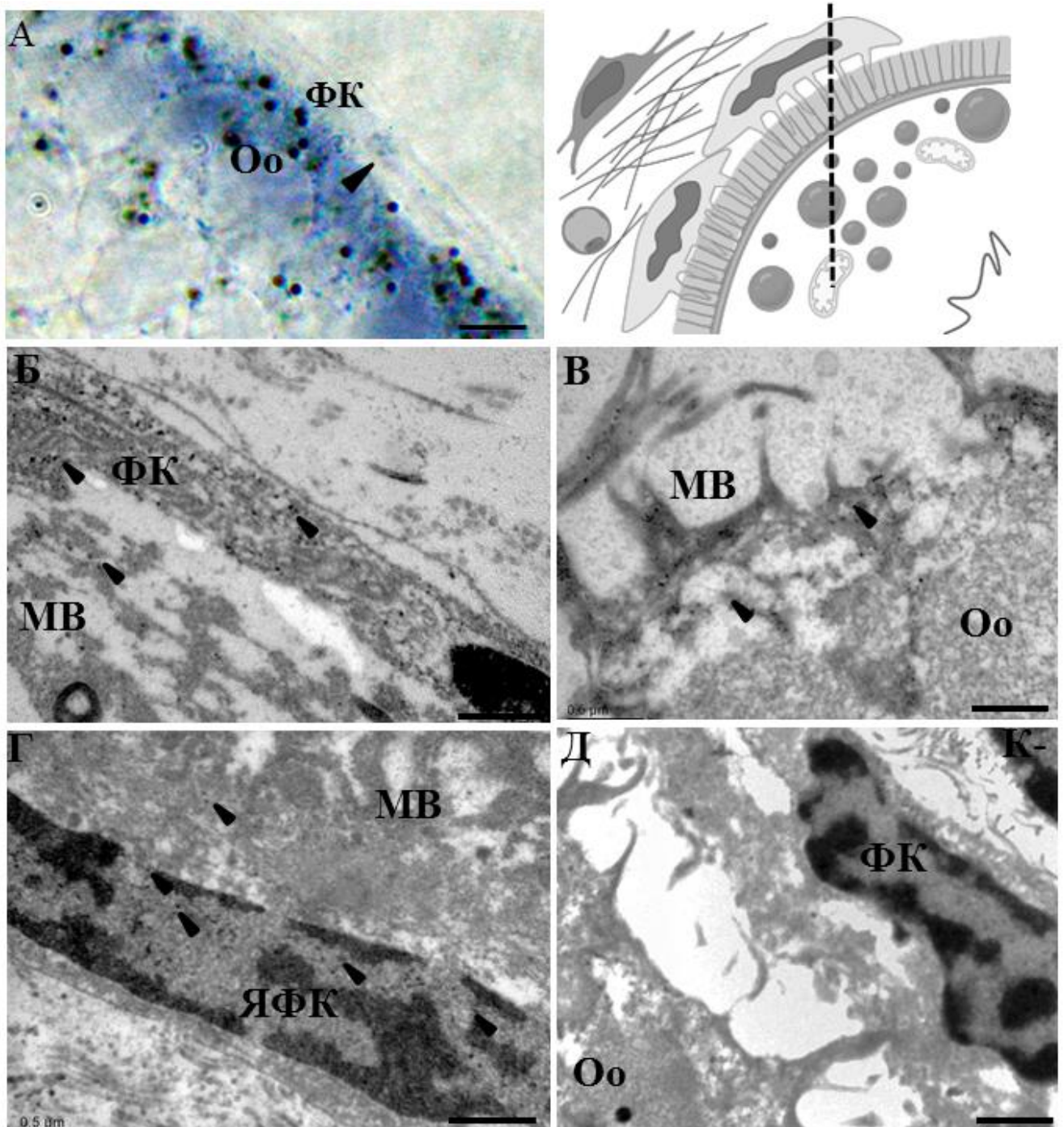


**Рисунок 17.** Иммуноокрашивание фолликулярных клеток антителами против белка Germes.

(А, Б, Г, Д) Ооцит стадии V–VI. (А, Б) Оптический срез фолликулярных клеток. Белок Germes (зеленый) обнаруживается в виде линейных структур в контактных зонах соседних фолликулярных клеток (острая стрелка), где колокализуется с F-актином (phalloidin-красный); ядра окрашены DAPI (голубой). (Г, Д) Макровилли на поверхности фолликулярных клеток (треугольная стрелка), обращенной к ооциту, содержат Germes. Ядра окрашены propidium iodide (PI-красный). (Е) На поперечном оптическом срезе белок Germes обнаруживается в контактных зонах соседних фолликулярных клеток, а также в области макровилл. (В) Ооцит стадии I–II. Начало образования линейных структур в контактных зонах. (Ж) Отрицательный контроль с преимунной сывороткой. ФК – фолликулярные клетки, Оо-ооцит. Масштабные отрезки: (А, В) 25, (Г, Д) 10, (Б, Е) 5, (Ж) 15 мкм. Пунктирной линией на схеме обозначена плоскость среза.

Тогда для оценки наличия мРНК в ФК был выбран тот же качественный метод *in situ* гибридизации, но с использованием антител, меченных коллоидным золотом (1 нм), при котором анализ проводился на ультратонких срезах при помощи трансмиссионной электронной микроскопии. Такой подход позволил точно установить локализацию мРНК *germes* в ФК ооцитов. Положительным контролем и доказательством, что гибридизация прошла успешно служило наличие частиц коллоидного золота на вегетативном полюсе ооцитов V–VI стадии в участках, богатых митохондриями, т.е. в половой плазме (Рис. 18Б). Крупницы коллоидного золота были обнаружены внутри ФК больших и малых фолликулов, причем не только в цитоплазме, но и ядре. Также метка находилась в зоне макро- и микровилл между ФК и ооцитом. Надо заметить, что плотность частиц на срезе внутри ФК была выше, чем в ПП ооцита. В дальнейшем, количественная оценка содержания мРНК *germes* в ФК и ооцитах подтвердит это наблюдение (см. ниже). Над слоем ФК располагается соединительно-тканная оболочка фолликула - тека. В ней, как и ожидалось, крупинок золота обнаружено не было.





**Рисунок 18.** Гибридизация *in situ* с зондом к мРНК *germes* с окраской ультратонких срезов антителами, меченными наночастицами золота.

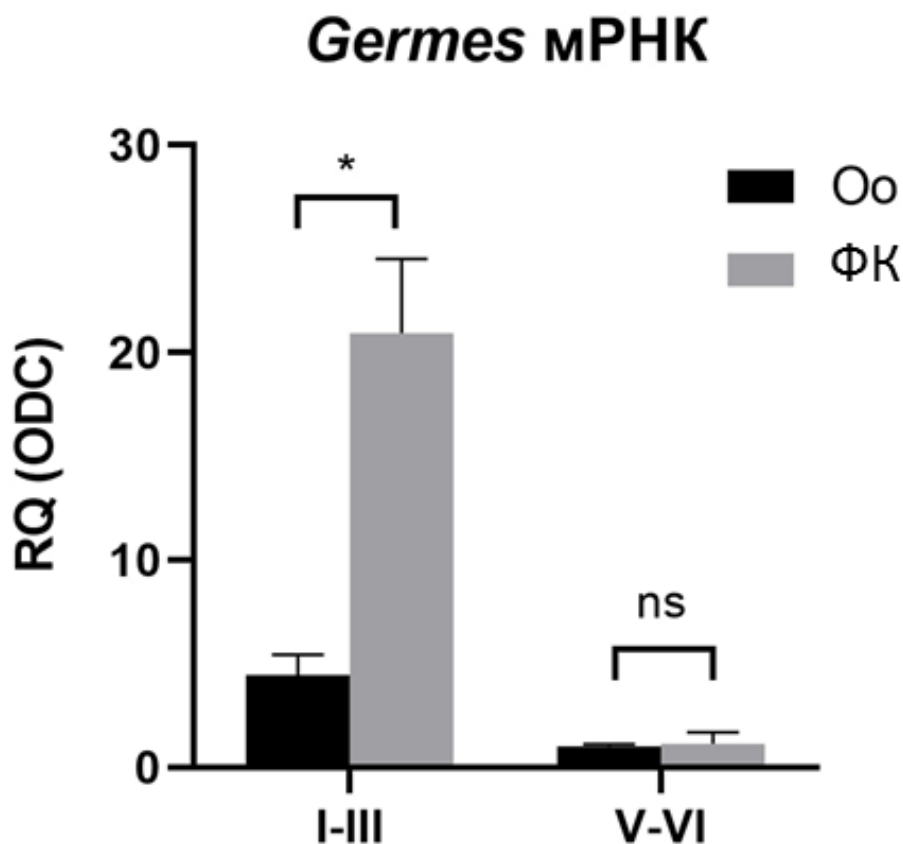
(А) Хромогенная гибридизация *in situ* ооцита стадии VI, стрелкой указано окрашенное ядро ФК (В, Г) Фолликулярная оболочка ооцита стадии VI. Транскрипт-Au в цитоплазме фолликулярной клетки (ФК) и макровиллах (МВ) (В), а также в ядре (ЯФК) (Г). (Д) Отрицательный контроль с использованием смыслового зонда *germes*. Масштабные отрезки: А 50 мкм, Б-Д 0.5 мкм. Пунктирной линией на схеме обозначена плоскость среза.

#### **4.3.2 Количественное соотношение мРНК *germes* в ооцитах и фолликулярных оболочках**

Подтвердив наличие мРНК *germes* в фолликулярной оболочке качественным методом, дальнейшим шагом было сравнить количество мРНК в ооцитах и ФК с них. Поскольку количество мРНК *germes* с ростом ооцита меняется, фолликулы были разделены на две группы: содержащие ооциты на стадиях малого (I–III) и большого роста (V–VI). Из яичников половозрелых лягушек получали фолликулы, содержащие ооциты V–VI стадий, а тонкие оболочки ФК (вместе с текой) снимали с них пинцетом под контролем стереомикроскопа. Сходным образом отделить оболочки, содержащие ФК, от ооцитов малого роста невозможно. Поэтому в этом случае использовали коллагеназу - фермент, расщепляющий пептидные связи. Инкубация фолликулов взрослых лягушек в растворе коллагеназы в течение 2-3 часов позволяет полностью отделить оболочки от ооцитов. Таким образом, двумя разными способами были получены образцы ооцитов и ФК, которые были использованы для выделения тотальной РНК. При помощи метода ПЦР-РВ было подтверждено наличие мРНК *germes* в ФК (рис. 19), причем ее содержание было сопоставимо с уровнем в ооцитах V–VI стадий. А количество транскрипта в ФК малых стадий ооцитов превышало количество в самих ооцитах примерно в 4 раза. Заметно, что количество РНК как в ооците, так и в ФК с ростом ооцита падает.

При сравнении количества мРНК в образцах нужно было определить, полностью ли отделялись оболочки от ооцитов. С помощью сканирующего электронного микроскопа была проанализирована поверхность ооцитов после мануального и ферментативного снятия оболочек. Выяснилось, что инкубация в растворе коллагеназы ооцитов V–VI стадий полностью отделяет все оболочки, тогда как при снятии пинцетом остается до трети. Если учитывать тот факт, что часть ФК остается на ооците, то количество транскрипта в ФК превышает экспрессию в ооцитах большого роста. Таким образом, двумя разными методами

было подтверждено наличие транскрипта *germes* в фолликулярной оболочке, имеющей соматическое происхождение.



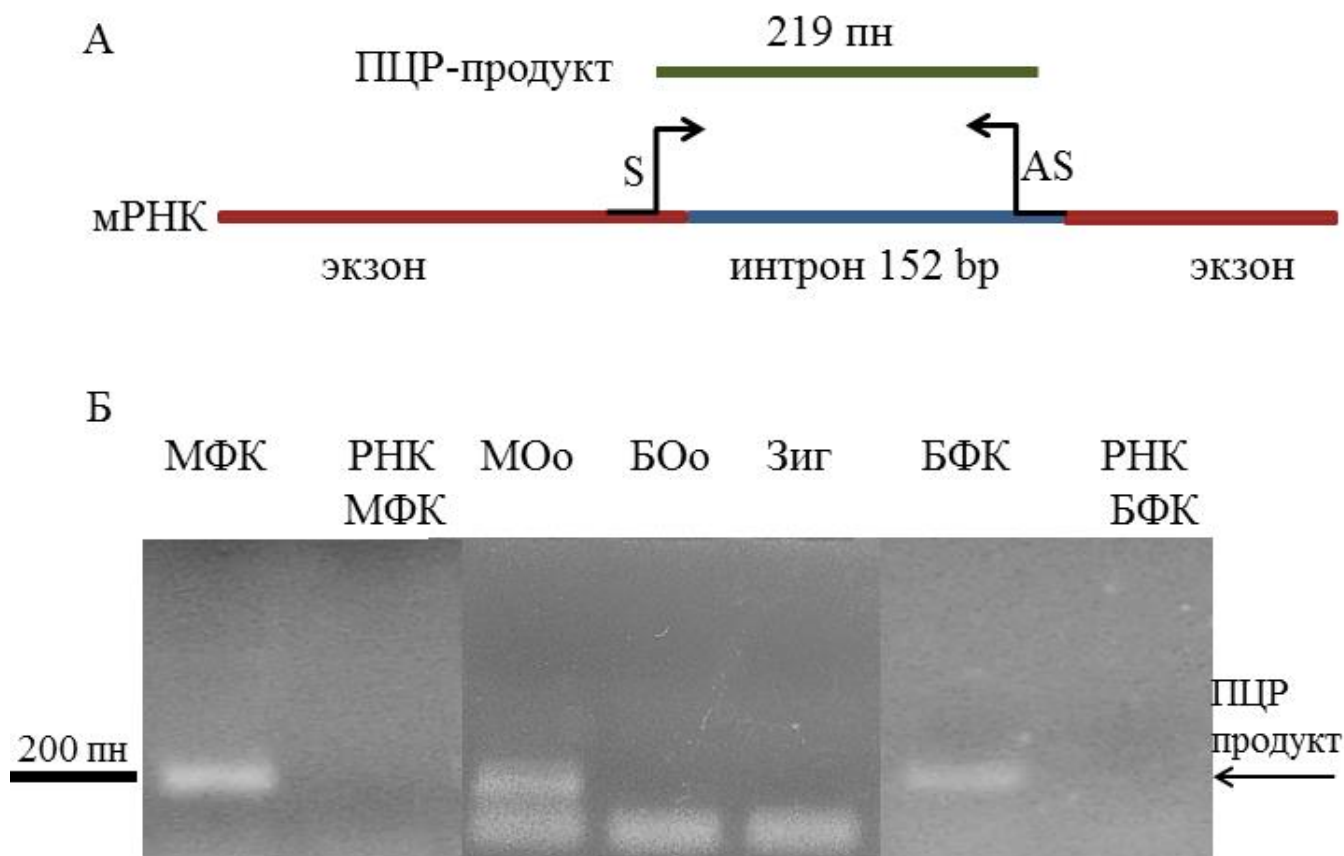
**Рисунок 19.** Относительные уровни экспрессии (RQ) мРНК *germes* в ооцитах и фолликулярных клетках, полученные с помощью ПЦР-РВ.

Относительные уровни экспрессии (RQ) рассчитывали с помощью метода  $\Delta\Delta Ct$ . В качестве референсного гена использовали ODC. Экспрессия в ооцитах стадии V–VI (Oo) принята за 1. Oo – ооциты стадии V–VI, ФК – фолликулярные оболочки с ооцитов. Статистический анализ выполнен с использованием U-критерия Манна-Уитни.

#### 4.4 Транскрипция гена *germes* в фолликулярных клетках

Различными методами было показано наличие РНК и белка *Germes* в фолликулярных клетках ооцита, имеющих мезодермальное происхождение. Ранее ген описывался исключительно как маркер половой плазмы, имеющий отношение только к половым клеткам. Однако, встает дополнительный вопрос о происхождении РНК и белка, экспрессируется ли РНК в самих ФК или это результат направленной межклеточной миграции макромолекул. Превышение количества удельной мРНК в фолликулярных оболочках, а также наличие РНК в

ядре говорит в пользу того, что клетки сами способны к экспрессии *germes*. Если это так, то в клетках должна присутствовать непротранскрибированная форма мРНК, которая является обязательным этапом после транскрипции перед сплайсингом мРНК эукариот. Основываясь на этом, дальнейшим шагом было проанализировать, есть ли данная форма в ФК разных стадий роста ооцитов. Оболочки с ооцитов отделялись описанным ранее способом. Для поиска непротранскрибированной формы мРНК с помощью ПЦР в геномной последовательности *germes* был выбран короткий интрон длиной 152 пн. Для постановки ПЦР использовался прямой праймер, комплементарный концу последовательности экзона, предшествующему выбранному интрону (рис. 20А). А последовательность обратного праймера соответствовала концу последовательности интрона. Если на электрофореграмме в образце после ПЦР присутствует фрагмент ДНК длиной 219 пн, можно сделать вывод, что в нем присутствует непротранскрибированная форма мРНК. Параллельно для контроля ложноположительного результата с гДНК (не смотря обработку РНК ДНКазой) в ПЦР использовались образцы тотальной РНК, выделенной из ФК, в том же количестве в перерасчете на кДНК (рис. 20Б). Обнаружение непротранскрибированной мРНК в ооцитах I–II стадий было ожидаемо, поскольку транскрипция РНК, использующей ранний путь локализации, происходит на самых ранних стадиях, а затем лишь сохраняется в кортексе вегетативного полюса. Обнаружение несплайсированной мРНК в ФК больших и малых фолликулов доказывает экспрессию *germes* в них на протяжении всего оогенеза.



**Рисунок 20.** Выявление непроцессированной мРНК *germes* в ооцитах и фолликулярных клетках с них с помощью ПЦР.

(А) Схема расположения экзонов и интрона в последовательности *germes* и схема подбора олигонуклеотидов (S, AS) для эксперимента. (Б) Методом ПЦР показано наличие интрона в составе тотальной мРНК. Непроцессированная мРНК обнаружена в фолликулярных оболочках как больших (БФК), так и малых ооцитов (МФК), а в ооцитах только малого роста (МОо). Стрелкой указано положение ПЦР-продукта. МОо– ооциты стадии I–III, БОо – ооциты V–VI стадии, Зиг – зигота, РНК МФК и РНК БФК – отрицательный контроль для исключения контаминации геномной ДНК образцов тотальной РНК фолликулярных клеток малых и больших ооцитов.

#### 4.5 Филогенетический анализ гена *germes* среди видов амфибий отряда

##### *Anura*

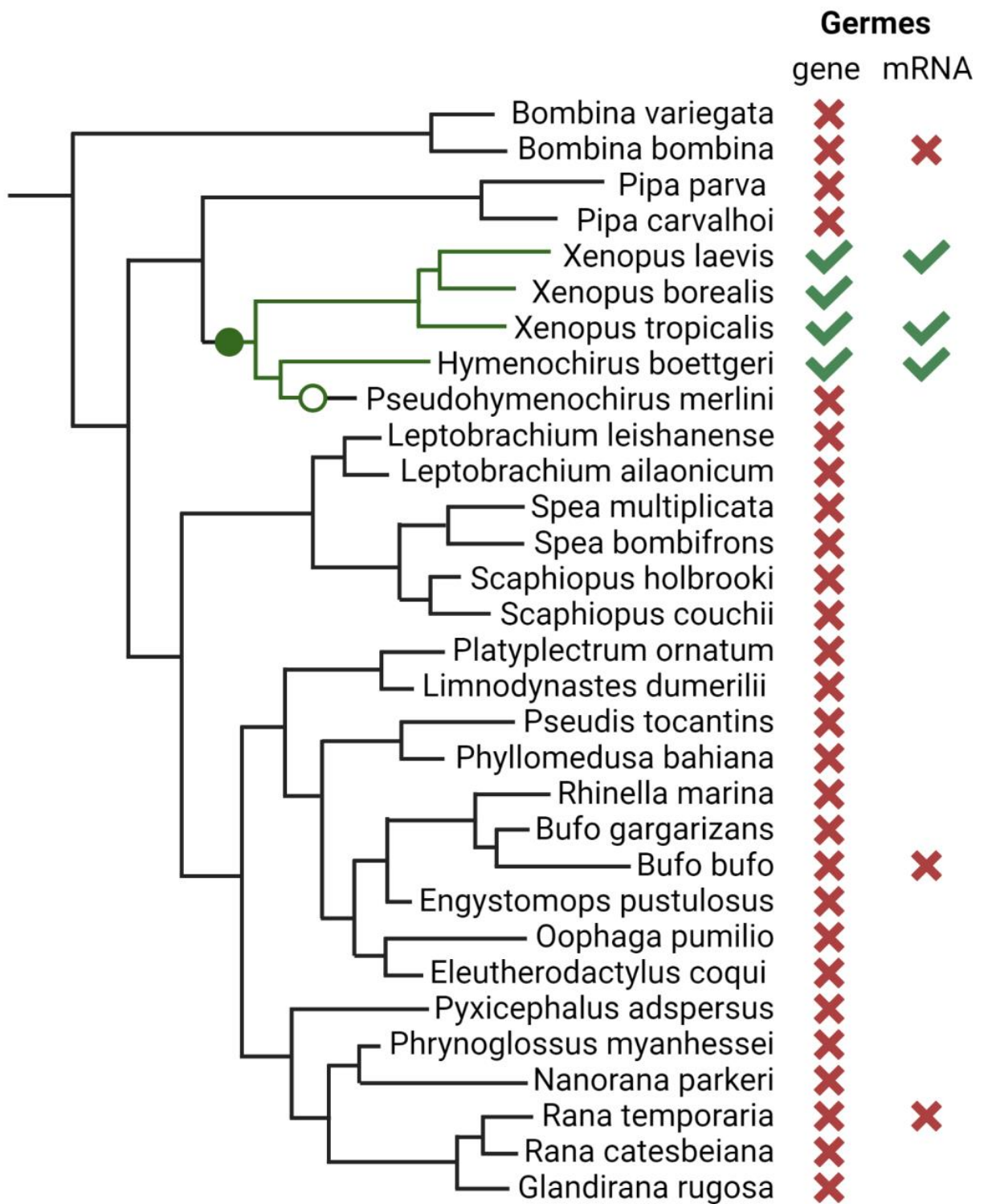
*Germes* характеризуется как маркер половой плазмы по содержанию его мРНК в ней, и как маркер первичных половых клеток по наличию белка. Оверэкспрессия мРНК *germes* и его мутантной формы с делецией мотива лейциновых застежек-молний (leucine zipper) снижает количество ППК, их подвижность и негативно влияет на их морфологию [Berekelya et al, 2007]. Таким образом, он необходим для правильного формирования ППК.

Однако *germes* был обнаружен и описан только для *Xenopus laevis*. Поэтому возник вопрос о существовании ортологов гена у других животных. Экспрессируется ли его мРНК в ооцитах других амфибий.

Для этого был проведен биоинформатический анализ геномных и транскриптомных последовательностей животных, имеющих половую плазму. Были сравнены нуклеотидные и белковые последовательности *germes* с имеющимися последовательностями различных групп животных в базе данных NCBI с помощью программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Поиск гомологов среди аннотированных нуклеотидных последовательностей различных животных базы данных NCBI привел только к одной. Это оказалась предсказанная последовательность мРНК близкого вида того же рода *Xenopus tropicalis* (XM\_031898982.1). Причем степень гомологии мРНК высокая – 79%.

Поскольку широкий поиск в различных группах животных не дал положительного результата, в дальнейшем мы сосредоточились на последовательностях лишь видов, принадлежащих к бесхвостым амфибиям. Далее анализировали последовательности в геномах Anura, доступных в базе данных NSBI. В геноме когтистой лягушки того же рода, *Xenopus borealis* (CM044435), была выявлена гомологичная последовательность *germes*. На основании данных последовательности генома *X. borealis* удалось собрать кодирующую последовательность транскрипта и соответствующий ей белок. Результат сравнения гомологичных последовательностей трех амфибий показал, что идентичность нуклеотидных и белковых последовательностей между *X. laevis* и *X. borealis* выше, чем между *X. laevis* и *X. tropicalis* (88% и 79% соответственно). Что легко объяснить, поскольку эти виды располагаются ближе на филогенетическом дереве (рис. 13).



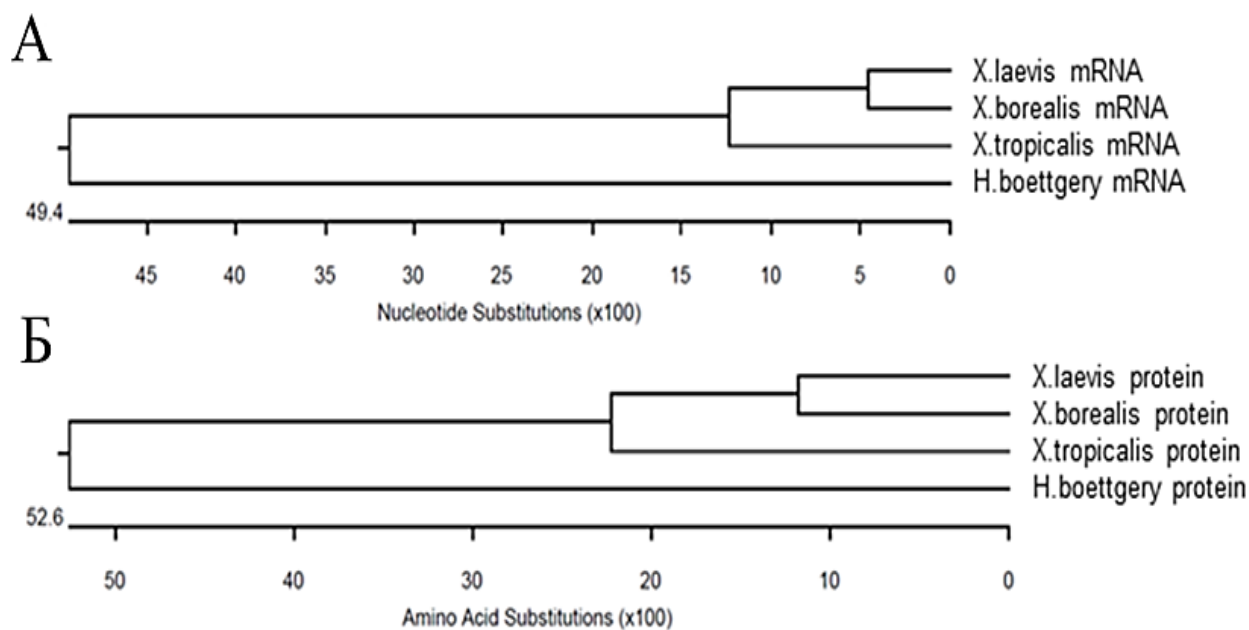


**Рисунок 13.** Распределение ортологов гена *germes* на филогенетическом дереве Anura. Виды, для которых был найден ген *germes* и его гомологи, отмечены зеленым цветом. Узлы, в которых предположительно появляется и исчезает этот ген, отмечены закрашенным и пустым кругом, соответственно. Филогенетическое дерево бесхвостых амфибий было построено на основе филогении семейств, представленной на онлайн-ресурсе [amphibiaweb.org](https://amphibiaweb.org) ([https://amphibiaweb.org/taxonomy/AW\\_FamilyPhylogeny.html](https://amphibiaweb.org/taxonomy/AW_FamilyPhylogeny.html)).

Гомолог *germes* был также найден в геноме малой когтистой лягушки *Hymenochirus boettgeri* (Tornier, 1896), которая также принадлежит к семейству Pipidae, как и три представителя рода *Xenopus*. Сопоставление нуклеотидных последовательностей показало, что идентичность *germes H. boettgeri* по сравнению с *X. laevis* составляет 74%. В геномах двух других родов семейства Pipidae, *Pipa* и *Pseudohymenochirus*, ортолог *germes* не был обнаружен ни по геномным последовательностям, ни по транскриптомным. Таким образом, гомологи последовательности *germes* не были найдены более ни в одном из геномов видов других семейств бесхвостых амфибий (рис. 13).

Полученные биоинформатические результаты были подтверждены путем исследования экспрессии ортологов *germes* в тканях яичников некоторых представителей бесхвостых амфибий. Для короткого (150 п.н.) консервативного участка мРНК *germes X. laevis* были разработаны олигонуклеотиды, которые полностью комплементарны последовательности мРНК *X. tropicalis*. С помощью ОТ-ПЦР были проанализированы транскрипты яичников из шести видов Anura (*X. laevis*, *X. tropicalis*, *H. Boettgeri*, *Rana temporaria*, *Bufo bufo* и *Bombina bombina*). Таким образом, были амплифицированы, клонированы и секвенированы короткие последовательности не только *X. laevis* и *X. tropicalis*, но и *H. Boettgeri*. ПЦР-анализ экспрессии гомологов *germes Rana temporaria*, *Bufo bufo* и *Bombina bombina* не выявил гомологичных последовательностей, подтвердив результаты биоинформатического анализа. Анализ полученного фрагмента подтвердил высокую гомологию нуклеотидных последовательностей *germes H. boettgeri* и *X. laevis* (74%) (рис. 14).





**Рисунок 14.** Анализ гомологии последовательностей ортологов гена *germes*. Филогенетическое дерево мРНК (А) и аминокислотных последовательностей (Б).

Согласно нашим результатам, *germes* встречается только в семействе Pipidae. К семейству Pipidae относятся южноамериканский род *Pipa* и три африканских рода - *Xenopus*, *Hymenochirus* и *Pseudhymenochirus* (Frost, 2023). Гомолог гена и транскрипт *germes* были обнаружены только у видов, принадлежащих к родам *Xenopus* и *Hymenochirus* (рис. 13). Мы провели множественный анализ последовательности белка *Germes* у четырех видов амфибий (рис. 14). Наибольшая гомология наблюдается между *X. laevis* и *X. borealis*, которые являются филогенетически самыми близкими друг к другу. Внутри рода *Xenopus* наименьшей гомологией обладает последовательность *X. tropicalis*. У вида *H. boettgeri* наблюдается самый низкий уровень гомологии среди четырех видов двух родов. Полученные данные об уровне гомологии последовательности *germes* полностью соответствуют представлениям о филогении этой группы. Поскольку показано негативное воздействие мутантной формы белка, лишенной LZ доменов, на формирование и миграцию ППК, мы также сравнили последовательность этого мотива у четырех видов амфибий. По нашим результатам, консенсусная последовательность лейциновой молнии

остается более или менее неизменной (рис. 15). Поскольку лейциновые молнии участвуют в белок-белковых взаимодействиях, то скорее всего, они необходимы белку для выполнения его функций. То есть можно ожидать, что оба домена лейциновых молний, которые, будут консервативными. Можно заключить, что ген *germes* возник в пределах семейства Pipidae, а позднее был утрачен в одной из линий, к которой относится род *Pseudhymenochirus* (рис. 13).

		Protein Identity:
<i>X.laevis</i>	FWD SYD LHL SRRMLDNSVHWQQDWDVKEQNE <u>LOGIEDRLKYTEAI LKEEE</u>	100%
<i>X.borealis</i>	FWD SYD LHL SRRMLDNSVHWQQDWDVKEQNE <u>LOGIEDRLKYTEAI LKEEE</u>	100%
<i>X.tropicalis</i>	FWD SYD LHL SRRMFDNSVNWQQDWDVKEHNE <u>LOGIENLLKYTEAI LKEED</u>	88%
<i>H.boettgery</i>	FWD SYD LHI SRNMYEN--NRQHDWDLKEQE <u>LOGIEKLENAEAI LKEEE</u>	71%

**Рисунок 15.** Множественное выравнивание последовательности белка *Germes*, содержащей лейциновую молнию.

Лейциновый мотив застежки-молнии (подчеркнут) является консервативным у трех видов амфибий семейства Pipidae.

## 5 ОБСУЖДЕНИЕ

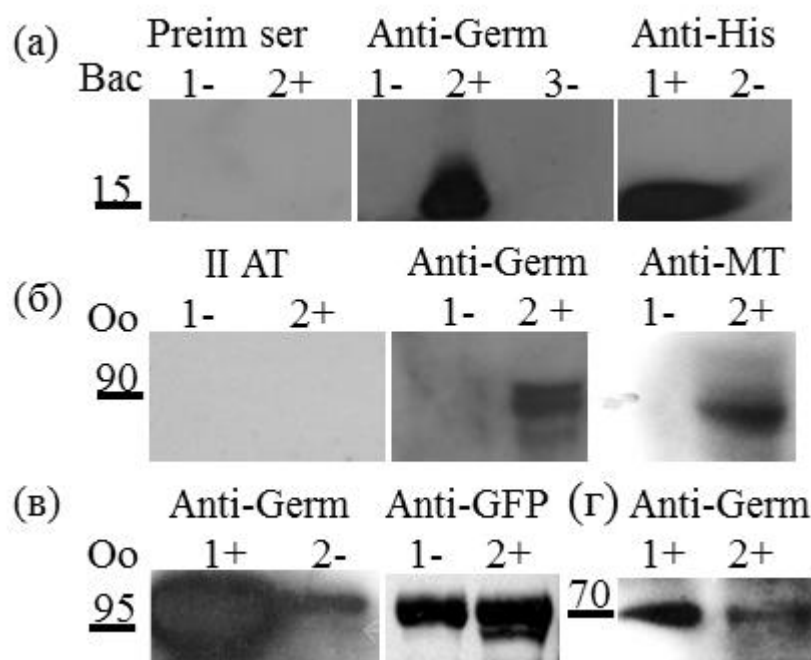
Несмотря на полувековые детальные исследования на молекулярном уровне, вопрос о происхождении и формировании половых клеток, даже у самых наиболее описанных организмов, остается неполностью раскрытым. А у многих животных даже не выяснено, каким из двух путей происходит выделение зародышевой линии (рис. 2). Поэтому изучение продуктов генов, локализующихся на вегетативный полюс, является актуальной задачей. В данной работе проведено исследование продуктов гена *germes*. мРНК *germes* локализуется сначала в МО, а потом на вегетативный полюс ооцита со стадии IV и является компонентом ПП. Распределение мРНК во время оогенеза повторяет паттерн поведения, описанный для других генов ПП. На основании временного характера экспрессии в раннем развитии и локализации РНК во время оогенеза *germes* можно сделать вывод, что транскрипт является материнским, входит в состав ПП и является ее ранним маркером.

Экспрессия *germes* начинается сразу, как только формируются ооциты I порядка. Данная картина наблюдалась на окрашенных яичниках молодых лягушек с помощью хромогенной *in situ* гибридизации. В оогониях экспрессия этого гена отсутствует. По способу локализации в МО, а затем и ПП, РНК *germes* относится к группе РНК, использующих ранний механизм локализации. С помощью *in situ* гибридизации на целых ооцитах видно, как распределенная по всему объему цитоплазмы РНК концентрируется в МО, а далее с ним перемещается на вегетативный полюс ооцита стадии III. Однако, заметно, что небольшая часть РНК остается в цитоплазме и не локализуется. Эти транскрипты в дальнейшем либо деградируют, либо позже, с использованием механизма позднего пути, транспортируются и локализуются в кортексе вегетативного полюса. В пользу второго предположения говорят результаты экспериментов, где мРНК *germes*, инъецированная в ооциты, способна к локализации позже. Кроме того, в последовательности 3'НТО обнаружены мотивы локализации, известные для других РНК, способные взаимодействовать с белками позднего пути. Среди

них последовательность VM1, которая связывает белок hnRNPI/VgRBP60/Ptbp1 [Cote et al., 1999; Lewis et al., 2004], что показано, например, для РНК *vg1*. Без VM1 локализация на вегетативный полюс по позднему пути невозможна [Gautreau et al., 1997]. Но не только мотив VM1, играет роль в локализации РНК по позднему пути. Показано, что мотивы MCLC и E2 также необходимы для РНК, локализующихся на вегетативный полюс с использованием как раннего, так и позднего пути [Choo et al., 2005]. Мотив E2 участвует во взаимодействии с белком Vg1RBP/Vera/Igf2bp3 [Betley et al., 2002; Kwon et al., 2002], хотя для многих РНК ПП показана необходимость связывания с белком Vg1RBP/Vera/Igf2bp3 для локализации в МО через E2 мотив [Betley et al., 2002]. Возможно, в разных условиях и на разных стадиях оогенеза, мотив E2 может участвовать как в механизме ранней локализации, так и в поздней. Суммируя вышеназванные косвенные данные, можно предположить, что все мотивы, обнаруженные в 3'НТО РНК, используются преимущественно для концентрации РНК в МО и локализации по раннему пути. Однако найдены и мотивы, которые могут направить оставшуюся РНК на вегетативный полюс по позднему пути с участием моторов цитоскелета. В любом случае, мРНК заякоревается в вегетативном кортексе ооцита в составе половой плазмы. Так РНК сохраняется длительное время весь оставшийся период оогенеза, чтобы осуществить свои функции в становлении первичных половых клеток.

Невозможно оценить активность гена, изучая только временную и пространственную картину РНК. Для анализа синтеза белка в ходе работы были получены и очищены поликлональные антитела из сыворотки кролика. Специфичность антител проверялась с помощью Вестерн-блоттинга. Для этого использовались лизаты бактерий *E. coli* и ооцитов *X. laevis*, в которых был индуцирован синтез, меченого различными эпитопами белок Germes. Чтобы подтвердить, что полоса на определенном уровне после процедуры Вестерн-блоттинга с окраской антителами против Germes верная, выполнялся параллельный протокол с окраской соответствующими антителами против белка-эпитопа (рис. 21). В качестве отрицательного контроля использовалась

преимунная сыворотка или окраска только вторичными антителами. Так, в бактериях с помощью индукции IPTG синтезировался белок, слитый с гистицином (His-Germes). В ооцитах был синтезирован рекомбинантный белок с эпитопами: с-мус (MT-Germes) и зеленый флюоресцентный белок (GFP-Germes). Также специфичность антител была подтверждена по появлению большего количества белка после синтеза в ооцитах V-VI стадий по сравнению с эндогенным.



**Рисунок 21.** Вестерн-блоттинг анализ специфичности поликлональных антител против белка Germes.

(А) Экспрессия His-Germes в бактериях *E. coli*. Окраска преимунной сывороткой (отрицательный контроль) не выявляет His-Germes в лизатах бактерий до индукции (1-) и после (2+). Окраска против Germes выявляет His-Germes на уровне 15 кДа после индукции (2+); отсутствует белок до индукции (1-) и после индукции другой плазмидой (отрицательный контроль). Антителами против His выявляется His-Germes на том же уровне после индукции (1+) и отсутствует до (2-). (Б) Экспрессия MT-Germes в ооцитах *X. laevis*. Окраска только вторичными антителами (отрицательный контроль) не выявляет MT-Germes в лизатах ооцитов до (1-) и после инъекции (2+). Окраска против Germes выявляет MT-Germes в лизате на уровне 90 кДа после инъекции в ооциты (2+); белок отсутствует в лизате до инъекции (1-). Антителами против MT выявляется MT-Germes на том же уровне после инъекции (2+) и отсутствует до (1-). (В) Экспрессия GFP- Germes в ооцитах *X. laevis*. Окраска против Germes выявляет GFP- Germes в лизате на уровне 95 кДа после инъекции в ооциты (1+); белок отсутствует в лизате до инъекции (2-). Антителами против GFP выявляется GFP-Germes на том же уровне после инъекции (2+) и отсутствует до (1-). (Г) Экспрессия Germes в ооцитах *X. laevis*. Окраска антителами против Germes выявляет оверэкспрессию Germes в лизате на уровне 70 кДа после инъекции в ооциты (1+); эндогенную экспрессию в лизате (2+).

Антитела позволили определить, что белок обнаруживается в ооцитах разных стадий. Возможно, белок начинает транслироваться сразу с появлением транскрипта в ооците I стадии. В ооцитах больших стадий (V-VI) белок обнаруживается в островках ПП. Так, по нашим данным, белок Germes меняет свою локализацию в течение оогенеза. Возможно, диффузно синтезированный белок не транспортируется и концентрируется на вегетативном полюсе, а деградирует полностью везде или частично, кроме вегетативно расположенного, и дополнительно там синтезируется с матриц вновь. Заключить, как долго транслируется Germes в оогенезе пока на основании наших данных пока невозможно. Оценить же стабильность белка *in vivo* было возможно. Для этого мы использовали циклогексимид, который ингибирует пептидилтрансферазную активность 60S-субъединицы рибосом у эукариот, т.е. блокирует синтез белка. Благодаря такому подходу, мы исследовали время жизни уже синтезированного белка. В ооциты *X. laevis* инъецировалась РНК, кодирующая GFP-Germes. В качестве контроля использовалась РНК GFP. Добавление циклогексимида останавливало трансляцию, и можно было наблюдать за уже синтезированным белком через некоторое время после инъекции с помощью конфокального микроскопа (за уровнем свечения GFP). Оказалось, что стабильность белка GFP-Germes была вполне сопоставима со стабильностью GFP. Время полужизни составило примерно 10 часов. Т.е. белок достаточно стабилен, и может сохраняться в раннем развитии. Что, возможно, и наблюдается в составе ПП внутри будущих ППК. Так, методом иммуногистохимии он обнаружен в ППК, которые на стадии 30 мигрируют в гонаду. Тем не менее, прямого доказательства, что видимые кластеры являются именно ППК, у нас нет. Однако, результаты иммуногистохимической окраски против других генов ПП *nanos* и *xiwi* (Lai et al., 2012), а также картина, окрашенных ППК с помощью гибридизации *in situ* на ген ПП *xpat*, выглядят сходным образом. Поэтому мы считаем, что выявленные клетки – это именно ППК. На контрасте с быстро деградирующей материнской РНК белок сохраняется значительно дольше. Скорее всего, он участвует в

сложном процессе спецификации ППК, так как его сверхэкспрессия негативно влияет на количество ППК и на их деление [Berekelya et al., 2007].

В течение фолликулогенеза в ооците происходят масштабные события, связанные с ростом и запасанием различных молекул, которые в меньшей степени необходимы во время оогенеза, например для поддержания мейотического блока, но в гораздо большей степени направлено на будущее успешное оплодотворение и развитие эмбриона. Еще до момента последнего расхождения оогониев внутри цисты устанавливается полярность будущего ооцита. Морфологически она пока никак не выражена, но ее можно обнаружить молекулярно-биологическими методами. Эта полярность связана с внутренней разметкой сигнальных РНК и белков. Благодаря установленным «границам» локализованные факторы будут иметь решающее значение в полярности ооцита, установлении осей зародыша, обособлении и дифференцировке эмбриональных закладок, а также отделении и спецификации половой линии. Концентрация ПП на вегетативном полюсе ооцита является ярким примером значимости механизмов полярности ооцита.

Показано, что агрегация ПП является результатом биомолекулярной конденсации. При этом сначала формируется каркас из корового белка Xvelo, который способен взаимодействовать с другими центральными РНК. На эту сложившуюся структуру «наслаиваются» другие РНК и белки половой плазмы. Germes, по-видимому, является таким вспомогательным участником. Похоже, что коровые белки и РНК являются более или менее универсальными у различных видов, а дополнительные могут различаться. ПП, и как следствие детерминационный тип образования ППК, в эволюции возникали множество раз независимым путем. Во время оогенеза происходит деметилирование хроматина, и может запускаться экспрессия разных генов, которые потом участвуют в образовании ПП. Этим можно объяснить, что у животных, имеющих ПП, мало гомологичных генов и наблюдается гетерохрония.

Последовательность 3'-НТО мРНК *germes* содержит сайты для связывания с различными белками для локализации в МО и на вегетативный полюс [Ponomarev et al., 2021]. Таким образом, мРНК активно регулирует свою локализацию с

помощью нескольких мотивов, чтобы очутиться в МО или ПП. По результатам ПЦР на несплайсированную форму, РНК синтезируется только в раннем оогенезе, а после локализации на вегетативный полюс лишь сохраняется. Чем индуцируется трансляция белка, и с какими еще белковыми партнерами взаимодействует Germes, чтобы входить в состав ПП – этот вопрос пока остается открытым. Исходя из данных о паттерне распределения белка по стадиям фолликула, его синтез запускается сразу с началом оогенеза. Когда синтез белка прекращается, тоже не ясно. Время полураспада белка 10 часов, и, возможно, он может транслироваться с РНК на любой стадии оогенеза или раннего развития. С другой стороны, особые механизмы предохраняют белки ПП от деградации. Так, может происходить с Germes в раннем развитии, когда количество материнской РНК стремительно падало, а белок сохранялся в составе ПП, а затем и ППК.

Предполагается, что белок Germes, как и DEADSouth, участвует в транслокации ППК с примембранного положения в околядерную область на стадии гастрюлы [Berekelya et al., 2003; Yamaguchi et al., 2013a]. При оверэкспрессии как нативной, так и мутантных форм белка Germes, наблюдается нарушение транслокации ПП [Berekelya et al., 2007]. По нашим данным, белок Germes плохо растворим. Известно, что АТФ, производимая митохондриями МО и ПП, служит гидролатом для РНП, тем самым помогая образоваться биоконденсатам - МО и ПП [Yang et al., 2022]. Т.е. несмотря на нерастворимость белка Germes, он входит в состав МО и ПП, благодаря механизмам взаимодействия РНК и белков в составе биоконденсатов. Когда же происходит нарушение транслокации ПП на стадии гастрюляции из-за оверэкспрессии белка или воздействия его мутантных форм, образуются агрегаты. Возможно, избыточность белка или нарушение его взаимодействия с другими РНП, приводит к нарушению образования биоагрегата, поэтому ПП уже не способна к нормальному перемещению к ядру внутри будущих ППК.

В последовательности белка Germes имеются лейциновые молнии, которые могут участвовать в связывании с другими партнерами. В работе Берекеля с соавторами было показано, что Germes связывается с легкими цепями динеина



[Berekelya et al., 2007]. А легкие цепи могут входить в комплекс динеинового мотора, или связываться напрямую с другими белками, функция которых не связана с моторами цитоскелета, и просто регулировать взаимодействие белков [Rapali et al., 2011]. Суммируя эти данные, можно предположить участие *Germes* в процессах внутриклеточного транспорта.

Анализируя пространственный паттерн белка *Germes* во время оогенеза *Xenopus*, мы обнаружили, что он содержится в фолликулярных клетках. Причем в ФК была обнаружена и РНК *germes*, до этого считающаяся маркером половой плазмы. Известно, что в отличие от ооцита, ФК являются производными эпителиального компартмента яичника, т.е. имеют соматическое происхождение (Ogielska, Kotusz, 2004). Наши данные о локализации РНК *germes* в ядре ФК, полученные методом гибридизации *in situ*, совмещенным с электронной микроскопией, навели на мысль о собственной экспрессии *germes* в ФК. Выявление несплайсированной формы мРНК как малых, так и больших фолликулов в ФК подтвердило наше предположение. Хотя количество РНК в ФК также снижалось с ростом фолликула, как это было обнаружено и в ооците. Все это может говорить в пользу того, что у *germes* в ФК есть функции, не связанные с участием в поддержании половой линии, а скорее всего с процессом транспорта. Для самих же ФК функции, связанные с процессом транспорта, являются ключевыми, поскольку множество работ показывают их необходимое участие во время роста и созревания ооцита.

В работе впервые показано, что *germes*, будучи геном половой плазмы, также экспрессируется в соматических клетках фолликула. В литературе такие же случаи пока не описаны. Существуют данные об экспрессии гена ПП *xpat* в клетках эктодермы в развитии *Xenopus* уже на стадии хвостовой почки [Machado et al., 2005], а также о незначительном содержании белка XVLG1 (*Xenopus Vasa like gene 1*) до стадии 42 в соматических клетках эмбрионов [Ikenishi et al., 1996]. Об их функциях в соматических клетках пока известно мало. Точечные данные об экспрессии генов ПП и ППК все же описаны для раннего онтогенеза, но не для системы ооцит-фолликулярные клетки, где ген *germes*, по-видимому, выполняет

разные функции для половой и соматической линии. Примечательно, что для гена *vasa*, ключевого детерминанта клеток половой линии, на ящерице *Podarcis sicula* тоже показана его экспрессия в соматических фолликулярных клетках [Maurizii et al., 2009]. Однако, морфологическое строение фолликула у рептилий и амфибий различается коренным образом. Ооцит и фолликулярные (грушевидные) клетки *P. sicula* соединены межклеточными мостиками. В этом случае, нельзя говорить о запуске экспрессии гена отдельно в клетках соматической и зародышевой линии, поскольку они способны обмениваться молекулами любого размера. У амфибий же фолликулярные клетки сообщаются с ооцитом посредством щелевых контактов, поэтому экспрессия *germes* в половых и соматических клетках фолликула, вероятнее всего, независима.

Окрашивание белка *Germes*, выявленного антителами, в зоне макровиллей, а также в приграничных зонах самих ФК может служить еще одним аргументом в пользу транспортной функции этого белка. Более того, по предсказанным данным, последовательность белка *Germes* может подвергаться модификации миристоилирования. Тем самым, белок способен взаимодействовать с плазматической мембраной со стороны цитоплазмы, что, возможно, мы и наблюдаем по картине локализации белка в ФК. Для ФК транспортные функции являются одной из важнейших, и транспортная функция белка может быть первоочередной. Однако в каких процессах может участвовать *Germes* пока не ясно.

Ген *germes* исследовался только у известного модельного организма *X. laevis*, где и была выяснена его значимая функция для становления зародышевой линии. Однако, о его наличии и экспрессии у других видов амфибий до этой работы было не известно. Поэтому, отдельным вопросом стал анализ распространенности гена *germes* среди амфибий, который и выявил его возникновение *de novo* в небольшой группе видов семейства Pipidae. Известно, что вирусная генетическая информация встраивается в клеточные геномы [Jalasvuori et al., 2012], привнося новые гены, а иногда и сохраняя специфическую функцию. У человека интегрированные в геном элементы ретротранспозонов

вливают в том числе и на спецификацию первичных половых клеток [Xiang et al., 2022]. Чаще, однако, быстрая мутация генома самого вируса делает практически невозможным проследить, от какого вируса произошел ген. Возможно, что *germes* внезапно появились в геноме Xenopodinae именно таким образом. При строгих условиях поиска гомолог был найден только у близкородственного вида того же рода. Более детальное изучение баз данных транскриптомов и баз данных геномов показало, что гомолог присутствует у двух других видов, точнее, в семействе Pipidae. Таким образом, ген мог возникнуть в узкой группе родов внутри этого семейства. Более того, некоторые представители уже утратили этот ген. Появление нового гена в результате внедрения вируса, с учетом отсутствия гомологов *germes* в геноме, кажется наиболее вероятным. Такое встраивание нестабильно, поэтому, хотя и поддерживается специфической функцией в организме, ген может быть снова потерян. В случае *germes*, наиболее удивительным фактом является то, что новый ген и кодируемый им белок сразу встроился в очень консервативный механизм детерминации первичных половых клеток.

## 6 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе проведено исследование распределения продуктов гена *germes* в фолликулогенезе и раннем развитии *X. laevis*. Эти результаты помогают лучше понять процесс формирования зародышевой линии, поскольку ген *germes* является одним из многих генов-маркеров половой плазмы и половых клеток.

Мы проанализировали, что мРНК и белок *Germes* появляются с первой стадии оогенеза и присутствуют весь период роста и созревания. Примечательно, что оба продукта гена меняют свой паттерн распределения с распространенного по всему объему до локализованного в островках половой плазмы. В 3'НТО РНК для ее локализации в оогенезе исследованы короткие мотивы, которые необходимы для перемещения РНК по раннему и позднему пути на вегетативный полюс. Что именно способствует перемещению и концентрации белка пока не очень ясно. Однако наличие лейциновых молний в последовательности белка говорит о наличии белковых партнеров, способствующих транслокации белка.

Мы исследовали и провели сравнение временного наличия РНК и белка в раннем развитии. Поскольку РНК является материнской, неудивительно, что к концу вторых суток развития она уже не детектируется. Главный же продукт, необходимый для поддержания зародышевой линии – белок, присутствует на протяжении всего раннего развития вплоть до головастика. Объяснить это можно тем, что белок остается только в первичных половых клетках в составе половой плазмы, где и осуществляет свои необходимые функции.

В данной работе впервые проведено исследование наличия гена половой плазмы и первичных половых клеток *germes* среди различных представителей амфибий. В литературе редко встречается анализ распространенности генов не только у модельных объектов, но и у соседних видов. Нами показано, что ген является довольно уникальным. Он появился и затем, по крайней мере, единожды пропал только внутри семейства Pipidae. Так гомолог гена *germes* был обнаружен у *Xenopus laevis*, *Xenopus borealis*, *Xenopus tropicalis* и *Hymenochirus boettgeri*. Примечателен факт, что у вида того же семейства соседнего рода

*Pseudhymenochirus merlini* ген уже утерян. Несмотря на такую узкую распространенность ген «смог» стать частью сложной машинерии в формировании половых клеток у амфибий семейства Pipidae. Появляется вопрос, какой белок замещает его функцию у видов, у которых *germes* уже не обнаруживается.

Впервые в данной работе описано, что ген половой плазмы и первичных половых клеток экспрессируется также и в соматических клетках, окружающих ооцит. Мы обнаружили, что в фолликулярных клетках происходит транскрипция РНК *germes*, а ее удельное содержание снижается с ростом ооцита. Белок в фолликулярных клетках имеет свою отличительную локализацию, он обнаруживается в виде линейных структур вдоль мембран внутри клеток - в местах их контактов друг с другом. Возможность миристоилирования последовательности белка может объяснить такую внутриклеточную локализацию. Также белок присутствует в макровиллях фолликулярных клеток, с участием которых, как известно, осуществляется коммуникация между ооцитом и прилегающей фолликулярной оболочкой. Различие в характере локализации и типах клеток по происхождению - соматических или зародышевых, с большой долей вероятности указывает о разнородных специфических функциях гена *germes*. Если функция гена в половой плазме ооцита для становления зародышевой линии известна, тогда как изучение роли *germes* в фолликулярных клетках может стать предметом дальнейших исследований. И появляется закономерный вопрос, экспрессируются ли другие известные маркеры половой плазмы в фолликулярных клетках, что также может стать новой перспективной задачей.

## 7 ВЫВОДЫ

1. мРНК *germes* присутствует на протяжении всего оогенеза, а после оплодотворения быстро деградирует, тогда как белок Germes выявляется на всех стадиях эмбрионального развития вплоть до хвостовой почки. мРНК и белок Germes в оогенезе локализованы схожим образом, а в онтогенезе в половой плазме и первичных половых клетках остается только белок.
2. В З'НТО мРНК *germes* присутствуют мотивы локализации в митохондриальное облако и на вегетативный полюс ооцита; Белок Germes содержит мотивы лейциновых молний и миристоилирования, определяющие белок-белковые взаимодействия и примембранную локализацию.
3. мРНК *germes*, в том числе ее несплайсированная форма, выявляется в фолликулярных клетках. В фолликулярных клетках белок Germes локализован в местах их клеточных контактов, а также области макровиллей.
4. Ген *germes* идентифицирован только у видов внутри семейства Pipidae – *Xenopus laevis*, *Xenopus borealis*, *Xenopus tropicalis* и *Hymenochirus boettgeri*, и не выявляется в геноме *Pseudhymenochirus merlini*.

## 8 ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

- 1) **Konduktorova V.V.**, Luchinskaya N.N. Follicular cells of the amphibian ovary: Origin, structure, and functions // Russian Journal of Developmental Biology. – 2013. – V. 44. – № 4. – P. 232–244. **IF(WoS) = 0.718 (0.7/ 0.3)**
- 2) Ponomarev M. B., **Konduktorova V. V.**, Luchinskaya N. N., Belyavsky A. V. Localization of Germes RNA in *Xenopus* Oocytes // Russian Journal of Developmental Biology. – 2021. – V. 52. – № 1. – P. 1–8. **IF(WoS) = 0.718 (0.46/ 0.15)**
- 3) **Konduktorova V.V.**, Luchinskaya N.N., Belyavsky A.V. Expression of the germes germ plasm gene in follicular cells of *X. laevis* oocytes // Russian Journal of Developmental Biology. – 2022. – V. 53. – № 5. – P. 350–362. **IF(WoS) = 0.718 (0.82/ 0.5)**
- 4) **Konduktorova V.V.**, Fofanova. E. G., Nikishin D. N. The Distribution of the Germ Plasm Gene germes among Anurans // Russian Journal of Developmental Biology. – 2023. – V. 54. – № 6. – P. 384–388. **IF(WoS) = 0.718 (0.23/ 0.13)**

\*В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах.

## 9 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aguero T., Kassmer S., Alberio R., Johnson A., King M. L. Mechanisms of Vertebrate Germ Cell Determination // Pelegri F. et al. (eds.), *Vertebrate Development, Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2017. – Ch. 8. – P. 383-440.
2. Albanese-Carmignani M. P., Zaccone G. A. Comparative cytochemical study of the yolk platelets in the growing oocytes of *Triturus cristatus* and *Rana esculenta* // *Acta Histochemica*. – 1977. – V. 59. – P. 273–284.
3. Albertini D. F., Anderson E. The appearance and structure of intercellular connections during the ontogeny of the rabbit ovarian follicle with particular reference to gap junctions // *Journal of Cell Biology*. – 1974. – V. 63. – № 1. – P. 234-50.
4. Al-Mukhtar K. A. K., Webb A. An Ultrastructural Study of Primordial Germ Cells, Oogonia and Early Oocytes in *Xenopus Laevis* // *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. – 1971. – V. 26. – № 2. – P. 195-217.
5. Anderson E. L., Baltus A. E., Roepers-Gajadien H. L., Hassold T. J., de Rooij D. G., van Pelt A. M., Page D. C. Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* – 2008. – V. 105. – P. 14976–14980.
6. Anderson R. A., Feathergill K. A., Drisdell R. C., Rawlins R. G., Mack S. R., Zaneveld L. J. Atrial natriuretic peptide (ANP) as a stimulus of the human acrosome reaction and a component of ovarian follicular fluid: correlation of follicular ANP content with in vitro fertilization outcome // *Journal of Andrology*. – 1994. – V. 15. – № 1. – P. 61-70.
7. Arkov A. L., Ramos A. Building RNA-protein granules: Insight from the germline // *Trends in Cell Biology*. – 2010. – V. 20. – №8. – P. 482–490.
8. Asashima M., Ito Y., Chan T., Michiue T., Nakanishi M., Suzuki K., Hitachi K., Okabayashi K., Kondow A., Ariizumi T. In vitro organogenesis from



- undifferentiated cells in *Xenopus* // *Developmental Dynamics*. – 2009. – V. 238. – № 6. P. 1309-1320.
9. Ascoli M., Fanelli F., Segaloff D.L. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective // *Endocrin. Rev.* – 2002. – V. 23. – P. 141–174.
10. Aslan Y., E. Tadjuidje, A. M. Zorn, S.-W. Cha High-efficiency non-mosaic CRISPR-mediated knock-in and indel mutation in F0 *Xenopus* // *Development* – 2017. – V. 144. – P. 2852–2858.
11. Banani S. F., Lee H. O., Hyman A. A., Rosen M. K. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2017. – V. 18. – P. 285–298.
12. Barton B. R., Hertig A. T. Ultrastructure of annulate lamellae in primary oocytes of chimpanzees (*Pan troglodytes*) // *Biology of Reproduction*. – 1972. – V. 6. – P. 98–108.
13. Bayaa M., Booth R.A., Sheng Y., Liu X. J. The classical progesterone receptor mediates *Xenopus* oocyte maturation through a nongenomic mechanism // *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. – 2000. – V. 97. – № 23. – P. 12607–12612.
14. Ben-Yehoshua J. L., Lewellyn A. L., Thomas P., Maller J. L. The role of *Xenopus* membrane progesterone receptor beta in mediating the effect of progesterone on oocyte maturation // *Molecular Endocrinology*. – 2007. – V. 21. – P. 664–73.
15. Berekelya L. A., Mikryukov A. A., Luchinskaya N. N., Ponomarev M. B., Woodland H. R., Belyavsky A.V. The protein encoded by the germ plasm RNA *Germes* associates with dynein light chains and functions in *Xenopus* germline development // *Differentiation*. – 2007. – V. 75(6). – P. 546–558.
16. Berekelya L. A., Ponomarev M. B., Luchinskaya N. N., Belyavsky A.V. *Xenopus Germes* encodes a novel germ plasm-associated transcript // *Gene Expression Patterns*. – 2003. – V. 3. – P. 521–524.

17. Betley J. N., Frith M. C., Graber J.H., Betley J. N., Frith M. C., Graber J.H. A ubiquitous and conserved signal for RNA localization in chordates // *Current Biology*. – 2002. – V. 12. – P. 1756–1761.
18. Betley J. N., Heinrich B., Vernos I, Sardet C., Prodon F., Deshler J. O. Kinesin II mediates Vg1 mRNA transport in *Xenopus* oocytes // *Current Biology*. – 2004. – V. 14. – P. 219–224.
19. Beyo R. S., Sreejith P., Divya L., Oommen O. V., Akbarsha M. A. Ultrastructural observations of previtellogenic ovarian follicles of the caecilians *Ichthyophis tricolor* and *Gegeneophis ramaswamii* // *Journal of morphology*. – 2007. – V. 268. – № 4. – P. 329–342.
20. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucleic Acids Research*. – 1979. – V. 7. – № 6. – P. 1513-1523.
21. Blackler A. W., Fischberg M. Transfer of primordial germ-cells in *Xenopus laevis* // *Journal of embryology and experimental morphology*. – 1961. – V.9. – P. 634–641.
22. Boke E., Ruer M., Wühr M., Coughlin M., Lemaitre R., Gygi S. P., Alberti S., Drechsel D., Hyman A. A., Mitchison T. J. Amyloid-like self-assembly of a cellular compartment // *Cell*. – 2016. – V. 166. – P. 637–650.
23. Bookout A. L., Cummins C. L., Mangelsdorf D. J. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR // *Current protocols in molecular biology* (Eds. Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K.) John Wiley & Sons, New York. – 2005. – P. 15.8.1-15.8.21.
24. Bounoure L. Recherches sur la lignee germinate chez la grenouille rousse aux premiers stades du developpement // *Annales des Sciences Naturelles*. – 1934. – V. 17. – P. 67-24.
25. Brangwynne C. P., Eckmann C. R., Courson D. S., Rybarska A., Hoege C., Gharakhani J., Jülicher F., Hyman A. A. Germline P granules are liquid droplets

- that localize by controlled dissolution/condensation // *Science*. – 2009. – V. 324. – P. 1729–1732.
26. Browne C. L., Werner W. Intercellular junctions between the follicle cells and oocytes of *Xenopus laevis* // *Journal of Experimental Zoology*. – 1984. – V. 230. – P. 105–113.
27. Bruzzone R., Hormuzdi S. G., Barbe M. T., Herb A. and Monyer H. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* – 2003. – V. 100. – P. 13644-13649.
28. Bruzzone R., White T. W., Yoshizaki G., Patino R., Paul D. L. Intercellular channels in teleosts: functional characterization of two connexins from Atlantic croaker // *FEBS Letters*. – 1995. – V. 358. – P. 301-304.
29. Buschiazzo J., Alonso T. S. Effect of meiotic maturation on yolk platelet lipids from *Bufo arenarum* oocytes // *Journal of Experimental Zoology*. – 2005. – V. 303. – P. 813–822.
30. Buschiazzo J., Bruzzone A., Alonso T. S. Detailed lipid analysis of yolk platelets of amphibian (*Bufo arenarum*) oocytes // *Journal of Experimental Zoology*. – 2003. – V. 297. – P. 189–195.
31. Butler A. M., Owens D. A., Wang L., King M. L. A novel role for sox7 in *Xenopus* early primordial germ cell development: Mining the PGC transcriptome // *Development*. – 2017. – V. 145. – P. 155978.
32. Carlson J. L., Bakst M. R., Ottinger M. A. Developmental stages of primary oocytes in turkeys // *Poult Sci*. – 1996. – V. 75. – P. 1569–1578.
33. Castrillon D. H., Quade B. J., Wang T. Y., Quigley C., Cru, C. P. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage // *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* – 2000. – V. 97. – P. 9585–9590.
34. Chan A. P., Kloc M., Bilinski S., Etkin L. D. The vegetally localized mRNA fatvg is associated with the germ plasm in the early embryo and is later expressed in the fat body // *Mechanisms of Development*. – 2001. – V. 100. – P. 137–140.

- 35.Chan A. P., Kloc M., Etkin L. D. *fatvg* encodes a new localized RNA that uses a 25-nucleotide element FVLE1 to localize to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes // *Development*. – 1999. – V. 126. – P. 4943–4953.
- 36.Chang P., Torres J., Lewis R.A., Mowry K. L., Houliston E., King M. L. Localization of RNAs to the mitochondrial cloud in *Xenopus* oocytes through entrapment and association with endoplasmic reticulum // *Molecular Biology of the Cell*. – 2004. – V. 15. – P. 4669–4681.
- 37.Chao Y., Gena M. D., Matthew M. C., Paul W. H. Remnants of the Balbiani body are required for formation of RNA transport granules in *Xenopus* oocytes // *iScience*. – 2022. – V. 25. – №. 3. – P. 103878.
- 38.Cheong C. G., Hall T. M. Engineering RNA sequence specificity of Pumilio repeats // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – V. 103 – №. 37. – P. 13635–13639.
- 39.Choo S., Heinrich B., Betley J. N., Chen Z., Deshler J. O. Evidence for common machinery utilized by the early and late RNA localization pathways in *Xenopus* oocytes // *Developmental Biology*. – 2005. – V. 278. – P 103–117.
- 40.Cieniewicz A. M., Woodruff R. I. Passage through vertebrate gap junctions of 17/18 kDa molecules is primarily dependent upon molecular configuration // *Tissue Cell*. – 2010. – V. 42. – P. 47–52.
- 41.Claussen M., Pieler T. Xvelo1 uses a novel 75-nucleotide signal sequence that drives vegetal.localization along the late pathway in *Xenopus* oocytes // *Developmental Biology*. – 2004. – V. 266 – №. 2. – P. 270–284.
- 42.Coggins L.W. An ultrastructure and radioautographic study of early oogenesis in the toad *Xenopus laevis* // *J. Cell. Sci*. – 1973. – V. 12. – P. 71–93.
- 43.Colozza G., De Robertis E.M. Maternal syntabulin is required for dorsal axis formation and is a germ plasm component in *Xenopus* // *Differentiation*. – 2014. – V. 88. – P. 17–26.
- 44.Conti M., Andersen C. B., Richard F., Mehats C., Chun S. Y., Horner K., Jin C., Tsafiriri A. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2002. – V. 187 – №. 1-2. – P. 153-9.

45. Conti M., Andersen C.B., Richard F., Shitsukawa K., Tsafiriri A. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2002. – V. 187. – P. 153–159.
46. Cote C. A., Gautreau D., Denegre J. M., Kress T. L., Terry N. A., Mowry K. L. A *Xenopus* protein related to hnRNP I has a role in cytoplasmic RNA localization // *Mol. Cell*. – 1999. – V. 4. – P. 431–437.
47. Cox R. T., Spradling A. C. A Balbiani body and the fusome mediate mitochondrial inheritance during *Drosophila* oogenesis // *Development*. – 2003. – V. 130. – P. 1579–1590.
48. Curran J. E., Woodruff R. I. Passage of 17 kDa calmodulin through gap junctions of three vertebrate species // *Tissue Cell*. – 2007. – V. 39. – P. 303–309.
49. De Boer T. P., van Veen T. A., Bierhuizen M. F., Kok B., Rook M. B., Boonen K. J., Vos M. A., Doevendans P. A., de Bakker J. M., van der Heyden M. A. Connexin43 repression following epithelium-to-mesenchyme transition in embryonal carcinoma cells requires Snail1 transcription factor // *Differentiation*. – 2007. – V. 75 – №. 3. – P. 208-218.
50. De Boer T. P., Kok K., Neuteboom K. I., Spieker N., De Graaf J., Destrée O. H., Rook M. B., Van Veen T. A., Jongsma H. J., Vos M. A., De Bakker J. M., Van Der Heyden MA. Cloning and functional characterization of a novel connexin expressed in somites of *Xenopus laevis* // *Developmental Dynamics*. – 2005a. – V. 233. – P. 864–971.
51. De Boer T. P., van der Heyden M. A. G. *Xenopus* connexins: how frogs bridge the gap // *Differentiation*. – 2005b. – V. 73. – P. 330–340.
52. Dekel N., Beers W.H. Rat oocyte maturation in vitro: relief of cyclic AMP inhibition by gonadotropins // *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. – 1978. – V. 75 – №. 9. – P. 4369–4373.
53. Dekel N., Galiani D., Sherizly I. Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 1988. – V. 56. – P. 115–121.

54. Deng J., Carbajal L., Evaul K., Rasar M., Jamnongjit M., Hammes S. R. Nongenomic steroid-triggered oocyte maturation: Of mice and frogs // *Steroids*. – 2009. – V. 74. – P. 595–601.
55. Deng J., Lang S., Wylie C., Hammes S. R. The *Xenopus laevis* isoform of G protein coupled receptor 3 (GPR3) is a constitutively active cell surface receptor that participates in maintaining meiotic arrest in *X. laevis* oocytes // *Molecular Endocrinology*. – 2008. – V. 22 – №. 8. – P. 1853–1865.
56. Deshler J. O., Highett M. I., Schnapp B. J. Localization of *Xenopus* Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum // *Science*. – 1997. – V. 276. – P. 1128–1131.
57. Downs S. M., Hunzicker-Dunn M. Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte–cumulus cell complex by site-selective analogs of cyclic adenosine monophosphate // *Developmental Biology*. – 1995. – V. 172. – P. 72–85.
58. Dressing G. E., Goldberg J. E., Charles N. J., Schwertfeger K. L., Lange C. A. Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues: a review of regulation and physiological implications. // *Steroids*. – 2011. – V. 76 – №. 1-2. – P. 11–7.
59. Dumont J. N., Brummett A. R. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). V. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues. // *Journal of Morphology*. – 1978. – V. 155. – P. 73-97.
60. Dumont J.N. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals // *Journal of Morphology*. – 1972. – V. 136. – P. 153–79.
61. Dumont J.N. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin): VI. The route of injected tracer transport in the follicle and developing oocyte // *Journal of Experimental Zoology*. 1978. V. 204. P. 193–217.
62. Dye Z. T., Rutledge L.W., Penuela S., Dyce P.W. Pannexin 1 inhibition delays maturation and improves development of *Bos taurus* oocytes // *Journal of Ovarian Research*. – 2020. – V.13. – P. 98.

63. Dzementsei A., Schneider D, Janshoff A, Pieler T. Migratory and adhesive properties of *Xenopus laevis* primordial germ cells in vitro // *Biology open*. – 2013. – V. 2. – №. 12. – P. 1279-1287.
64. Elkouby Y. M., Jamieson-Lucy A., Mullins M. C. Oocyte polarization is coupled to the chromosomal bouquet, a conserved polarized nuclear configuration in meiosis // *PLoS Biology*. – 2016. – V. 14. – №1. – P. 1002335.
65. el-Zein G., Boujard D., Garnier D.H., Joly J. The dynamics of the steroidogenic response of perfused *Xenopus* ovarian explants to gonadotropins // *General and Comparative Endocrinology*. – 1988. – V. 71. – P. 132–140.
66. Evaul K., Jamnongjit M., Bhagavath B., Hammes S. R. Testosterone and progesterone rapidly attenuate plasma membrane Gbetagamma mediated signaling in *Xenopus laevis* oocytes by signaling through classical steroid receptors // *Molecular Endocrinology*. – 2007. – V. 21. – № 1. – P. 186–196.
67. Falconi R., Petrini S., Quaglia A., Zaccanti F. Fine structure of undifferentiated gonads in *Rana dalmatina* tadpoles // *Italian Journal of Zoology*. – 2001. – V. 68. – P. 15–21.
68. Ferrell J. E. Jr. *Xenopus* oocyte maturation: new lessons from a good egg // *BioEssays*. – 1999. – V. 21. – №10. – P. 833-842.
69. Finn R. N. Vertebrate yolk complexes and the functional implications of phosvitins and other subdomains in vitellogenins // *Biology of Reproduction*. – 2007. – V. 76. – P. 926–935.
70. Forristall C., Pondel M., Chen L., King M.L. Patterns of localization and cytoskeletal association of two vegetally localized RNAs, Vg1 and Xcat-2 // *Development*. – 1995. – V. 121. – P. 201–208.
71. Fortune J. E. Steroid production by *Xenopus* ovarian follicles at different developmental stages // *Developmental Biology*. – 1983. – V. 99. – P. 502–509.
72. Fukui A., Nakamura T., Sugino K., Takio K., Uchiyama H., Asashima M., Sugino H. Isolation and characterization of *Xenopus* follistatin and activins // *Developmental Biology*. – 1993. – V. 159. – P. 131–139.

73. Fukui A., Nakamura T., Uchiyama H., Sugino K., Sugino H., Asashima M. Identification of activins A, AB, and B and follistatin proteins in *Xenopus* embryos // *Developmental Biology*. – 1994. – V. 163. – P. 279–281.
74. Fukui A., Shiurba R., Asahima M. Activin incorporation into vitellogenic oocytes of *Xenopus laevis* // *Molecular Biology of the Cell*. – 1999. – V. 45. – P. 545–554.
75. Gagnon J. A., Kreiling J. A., Powrie E. A., Wood T. R., Mowry K. L., Directional transport is mediated by a dynein-dependent step in an RNA localization pathway // *PLoS Biology*. – 2013. – V. 11. – №4. – P. 1001551.
76. Gallo C. J., Hand A. R., Jones T. L., Jaffe L. A. Stimulation of *Xenopus* oocyte maturation by inhibition of the G-protein alpha S subunit, a component of the plasma membrane and yolk platelet membranes // *Journal of Cell Biology*. – 1995. – V. 130. – № 2. – P. 275–284.
77. Gard D. L. Confocal microscopy and 3-D reconstruction of the cytoskeleton of *Xenopus* oocytes // *Microscopy Research and Technique*. – 1999. – V. 44. – P. 388–414.
78. Gautreau D., Cote C. A., Mowry K. L. Two copies of a subelement from the Vg1 RNA localization sequence are sufficient to direct vegetal localization in *Xenopus* oocytes // *Development*. – 1997. – V. 124. – №24. – P. 5013-5020.
79. Gavis E. R., Curtis D., Lehmann R. Identification of *cis*-acting sequences that control *nanos* RNA localization // *Developmental Biology*. – 1996. – V. 176. – P. 36–50.
80. Gilula N. B., Epstein M. L., Beers W. H. Cell-to-cell communication and oovulation. A study of the cumulus– oocyte complex // *Journal of Cell Biology*. – 1978. – V. 78. – P. 58–75.
81. Gimlich R. L., Kumar N. M., Gilula N. B. Differential regulation of the levels of three gap junction mRNAs in *Xenopus* embryos // *Journal of Cell Biology*. – 1990. – V. 110. – P. 597–605.



82. Gohin M., Bodinier P., Fostier A., Bobe J., Chesnel F. Aromatase expression in *Xenopus* oocytes: a three cell type model for the ovarian estradiol synthesis // *Journal of Molecular Endocrinology*. – 2011. – V. 47. – P. 241–250.
83. Goldberg G. S., Valiunas V., Brink P. R. Selective permeability of gap junction channels // *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. – 2004. – V. 1662. – №. 1–2. – P. 96-101.
84. Grant B., Hirsh D. Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte // *Molecular Biology of the Cell*. – 1999. – V. 10. – P. 4311-4326.
85. Grieder N. C., Cuevas M. de, Spradling A.C. The fusome organizes the microtubule network during oocyte differentiation in *Drosophila* // *Development*. – 2000. – V. 127. – P. 4253–4264.
86. Gutreau D., Cote C. A., Mowry K. L. Two copies of a subelement from the Vg1 RNA localization sequence are sufficient to direct vegetal localization in *Xenopus* oocytes // *Development*. – 1997. – V. 124. – №24. – P. 5013-5020.
87. Haccard O., Dupré A., Liere P., Pianos A., Eychenne B., Jesus C., Ozon R. Naturally occurring steroids in *Xenopus* oocyte during meiotic maturation. Unexpected presence and role of steroid sulfates // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2012. – V. 362. – P. 110–119.
88. Hamazaki T. S., Iuchi I., Yamagami K. Purification and identification of vitellogenin and its immunohistochemical detection in growing oocytes of the teleost, *Oryzias latipes* // *Journal of Experimental Zoology*. – 1987. – V. 242. – P. 333–341.
89. Hansen C. L., Pelegri F. Primordial Germ Cell Specification in Vertebrate Embryos: Phylogenetic Distribution and Conserved Molecular Features of Preformation and Induction // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – V. 9. – P. 730332.
90. Harris A. L. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. – 2007. – V. 94. – №2. – P. 120–143.

91. Harris J. D., Hibler D. W., Fontenot G. K., Harris J. D., Hibler D. W., Fontenot G. K. Curran alian – species the ZPA, ZPB and ZPC gene families // DNA Sequence. – 1994. – V. 4. – № 6. – P. 361–393.
92. Haston K. M., Tung J. Y., Pera R. A. R. Dazl functions in maintenance of pluripotency and genetic and epigenetic programs of differentiation in mouse primordial germ cells in vivo and in vitro // *PLoS One*. – 2009. – V. 4. – N. 5. – P. 5654.
93. Heasman J., Quarmby J., Wylie C. C. The mitochondrial cloud of *Xenopus* oocytes: The source of germinal granule material // *Developmental Biology*. – 1984. – V. 105. – P. 458–469.
94. Hedrick J. L. Anuran and pig egg zona pellucida glycoproteins in fertilization and early development // *International Journal of Developmental Biology*. – 2008. – V. 52. – P. 683–701.
95. Heim A. E., Hartung O., Rothhamel S., Ferreira E., Jenny A., Marlow F. L. Oocyte polarity requires a Bucky ball-dependent feedback amplification loop // *Development*. – 2014. V. 141. – P. 842–854.
96. Heinrich B., Deshler J. O. RNA localization to the Balbiani body in *Xenopus* oocytes is regulated by the energy state of the cell and is facilitated by kinesin II // *RNA*. – 2009. – V. 15. – № 4. – P. 524-536.
97. Hinkley C. S, Martin J. F., Leibham D., Perry M. Sequential expression of multiple POU proteins during amphibian early development // *Molecular Biology of the Cell*. – 1992. – V. 12. – № 2. – P. 638-649.
98. Houston D. W. Regulation of cell polarity and RNA localization in vertebrate oocytes // *International Review of Cell and Molecular Biology*. – 2013. – V. 306. – P. 127-185.
99. Houston D. W., Zhang J., Maines J. Z., Wasserman S. A., King M. L. A *Xenopus* DAZ-like gene encodes an RNA component of germ plasm and is a functional homologue of *Drosophila* boule // *Development*. – 1998. – V. 125. – № 2. – P. 171–180.

100. Houston D.W., King M.L. Germ plasm and molecular determinants of germ cell fate // *Current Topics in Developmental Biology*. – 2000a. – V. 50. – P. 155-182.
101. Howard G. C., Kaser M. R. Making and using antibodies // CRC Press. – 2007.
102. Hsü C. Y., Lü M. H., Huang H. T., Liang H. M. The correlation of fine structure with endocrine function of ovarian follicle cells in tadpoles // *General and Comparative Endocrinology*. – 1985. – V. 57. – № 1. – P. 77–87.
103. Hudson C., Woodland H. R. Xpat, a gene expressed specifically in germ plasm and primordial germ cells of *Xenopus laevis* // *Mechanisms of Development*. – 1998. – V. 73. – № 2. – P. 159-168.
104. Ikenishi K., Kotani M., Tanabe K Ultrastructural changes associated with UV irradiation in the “germinal plasm” of *Xenopus laevis* // *Developmental Biology*. – 1974. – V. 36. – P. 155–168.
105. Ikenishi K., Tanaka T. S., Komiya T. Spatio-temporal distribution of the protein of *Xenopus vasa* homologue (*Xenopus vasa*-like gene 1, XVLG1) in embryos // *Development Growth & Differentiation*. – 1996. – V. 38 – № 5. – P. 527-535.
106. Ishiguro K. I., Matsuura K., Tani N., Takeda N., Usuki S., Yamane M., Sugimoto M., Fujimura S., Hosokawa M., Chuma S., Ko MSH, Araki K, Niwa H. MEIOSIN directs the switch from mitosis to meiosis in mammalian germ cells // *Developmental Cell*. – 2020. – V. 52. – P. 429–445.
107. Ivanov A.V., Korovina A.N., Tunitskaya V.L., Ivanov A. V., Korovina A. N., Tunitskaya V. L. Development of the system ensuring a high-level expression of hepatitis C virus nonstructural NS5B and NS5A proteins // *Protein Expression and Purification*. – 2006. – V. 48 – № 1. – P. 14–23.
108. Ivanova M. D., Gregoraszczyk E. L., Augustowska K., Kolodziejczyk J., Mollova M. V., Kehayov I. R. Localization of atrial natriuretic peptide in pig granulosa cells isolated from ovarian follicles of various size // *Biology of Reproduction*. – 2003. – V. 3. – № 2. – P. 173-181.

109. Iwasawa H., Yamaguchi K. Ultrastructural study of gonadal development in *Xenopus laevis* // Zoological Science Japan. – 1984. – V. 1. – P. 591–600.
110. Jacobelli S., Hanocq J., Baltus E., Brachet J. Hormone-induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes: Effects of different steroids and study of the properties of a progesterone receptor // Differentiation. – 1974. – V. 2. – P. 129–135.
111. Jalasvuori M. Revolutionary Struggle for existence: introduction to four intriguing puzzles in virus research // In Viruses: Essential Agents of Life; Witzany, G., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht. – 2012. – P. 1–19.
112. Jambhekar A., Derisi J. L. Cis-acting determinants of asymmetric, cytoplasmic RNA transport // RNA. – 2007. – V. 13. – №5. – P. 625-642.
113. Jamieson-Lucy A., Mullins M. C. The vertebrate Balbiani body, germ plasm, and oocyte polarity // Current Topics in Developmental Biology. – 2019. – V. 135. – P. 1–34.
114. Jaruzelska J., Kotecki M., Kusz K., Spik A., Firpo M., Reijo Pera R. A. Conservation of a Pumilio-Nanos complex from *Drosophila* germ plasm to human germ cells // Development Genes and Evolution. – 2003. – V. 213. – P. 120–126.
115. Jesus C., Ozon R. How does *Xenopus* oocyte acquire its competence to undergo meiotic maturation? // Biology of the Cell. – 2004. – V. 96. – P. 187–192.
116. Johnson A. D., Richardson E., Bachvarova R. F., Crother B. I. Evolution of the germ line-soma relationship in vertebrate embryos // Reproduction. – 2011. – V. 141. – P. 291–300.
117. Josefsberg B. Y. L., Lewellyn A. L., Thomas P., Maller J. L. The role of *Xenopus* membrane progesterone receptor beta in mediating the effect of progesterone on oocyte maturation // Molecular Endocrinology. – 2007. – V. 21. – № 3. – P. 664–673.
118. Julaton V. T., Reijo Pera R. A. NANOS3 function in human germ cell development // Hum Mol Genet. – 2011. – V. 20. – № 11. – P. 2238-2250.

119. Juliano C., Wang J., Lin H. Uniting germline and stem cells: The function of Piwi proteins and the piRNA pathway in diverse organisms // *Annual Review of Genetics*. – 2011. – V. 45. – P. 447–469.
120. Kamimura M., Ikenishi K., Kotani M., Matsuno T. Observations on the migration and proliferation of gonocytes in *Xenopus laevis* // *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. – 1976. – V. 36. – P. 197–207.
121. Kamimura M., Kotani M., Yamagata K. The migration of presumptive primordial germ cells through the endodermal cell mass in *Xenopus laevis*: a light and electron microscopic study // *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. – 1980. – V. 59. – P. 1–17.
122. Kato M., McKnight S. L. A solid-state conceptualization of information transfer from gene to message to protein // *Annual Review of Biochemistry*. – 2016. – V. 87. – P. 1–40.
123. Kessi E., Guixé V., Preller A., Ureta T. Glycogen synthesis in amphibian oocytes: Evidence for an indirect pathway // *Journal of Biochemistry*. – 1996. – V. 315. – P. 455–460.
124. Kidder G. M., Vanderhyden B. C. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2010. – V. 88. – P. 399–413.
125. Kim S. H., Cho K. W., Oh S. H., Hwang Y. H., Lim S. H., Ryu H., Seul K. H., Jeong G. B., Yoon S. Immunoreactive atrial natriuretic peptides in the oocyte // *Comparative Biochemistry and Physiology Comparative Physiology*. – 1993. – V. 104. – №2. – P. 219–223.
126. King M. L., Messitt T. J., Mowry K. L. Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte // *Biology of the Cell*. – 2005. – V. 97. – №1. – P. 19–33.
127. Kirilenko P., Weierud F. K., Zorn A. M., Woodland H. R. The efficiency of *Xenopus* primordial germ cell migration depends on the germplasm mRNA encoding the PDZ domain protein Grip2 // *Differentiation*. – 2008. – V. 76. – №4. – P. 392–403.

128. Kislaukis E. H., Singer R. H. Determinants of mRNA localization // *Current Opinion in Cell Biology*. – 1992. – V. 4. – P. 975–978.
129. Kloc M., Bilinski S., Chan A. P., Allen L. H., Zearfoss N. R., Etkin L. D. RNA localization and germ cell determination in *Xenopus* // *International Review of Cytology*. – 2001. – V. 203. – P. 63–91.
130. Kloc M., Bilinski S., Dougherty M. T., Brey E. M., Etkin L. D. Formation, architecture and polarity of female germline cyst in *Xenopus* // *Developmental Biology*. – 2004a. – V. 266. – P. 43–61.
131. Kloc M., Bilinski S., Etkin L. D. The Balbiani body and germ cell determinants: 150 years later // *Current Topics in Developmental Biology*. – 2004b. – V. 59. – P. 1–36.
132. Kloc M., Dougherty M. T., Bilinski S., Chan A. P., Brey E., King M. L. Patrick C. W., Jr., Etkin L. D. Three-dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution within germinal granules of *Xenopus* // *Developmental Biology*. – 2002b. – V. 241. – №1. – P. 79–93.
133. Kloc M., Etkin L. D. Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes // *Development*. – 1995. – V. 121. – № 2. – P. 287-297.
134. Kloc M., Jedrzejowska I., Tworzydło W., Bilinski S. M. Balbiani body, nuage and sponge bodies--term plasm pathway players // *Arthropod Structure & Development*. – 2014. – V. 43. – № 4. – P. 341-348.
135. Kloc M., Larabell C., Etkin L. D. Elaboration of the messenger transport organizer pathway for localization of RNA to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes // *Developmental Biology*. – 1996. – V. 180. – № 1. – P. 119-130.
136. Kloc M., Reddy B. A., Miller M., Eastman E., Etkin L. D. x121: a localized maternal transcript in *Xenopus laevis* // *Molecular Reproduction and Development*. – 1991 – V. 28. – № 4. – P. 341-345.
137. Kloc M., Wilk K., Vargas D., Shirato Y., Bilinski S., Etkin L. D. Potential structural role of non-coding and coding RNAs in the organization of the

- cytoskeleton at the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes // *Development*. – 2005. – V. 132. – № 15. – P. 3445-3457.
138. Kloc M., Zearfoss N. R., Etkin L. D. Mechanisms of subcellular mRNA localization // *Cell* – 2002a. – V. 108. – P. 533–544.
139. Kobayashi S., Amikura R., Okada M. Localization of mitochondrial large rRNA in germinal granules and the consequent segregation of germ line // *The International Journal of Developmental Biology*. – 1994. – V. 38. – P. 193–199.
140. Konduktorova V.V., Fofanova. E. G., Nikishin D. N. The Distribution of the Germ Plasm Gene *germes* among Anurans // *Russian Journal of Developmental Biology*. — 2023. — V. 54. — N. 6. — P. 384–388.
141. Konduktorova V.V., Luchinskaya N.N. Follicular cells of the amphibian ovary: Origin, structure, and functions // *Russian Journal of Developmental Biology*. — 2013. — V. 44. — N. 4. — P. 232–244.
142. Konduktorova V.V., Luchinskaya N.N., Belyavsky A.V. Expression of the *germes* germ plasm gene in follicular cells of *X. laevis* oocytes // *Russian Journal of Developmental Biology*. — 2022. — V. 53. — N. 5. — P. 350–362.
143. Kubo H., Kawano T., Tsubuki S., Kotani M., Kawasaki H., Kawashima S. Egg envelope glycoprotein gp37 as a *Xenopus* homolog of mammalian ZP1, based on cDNA cloning // *Development, Growth & Differentiation*. – 2000. – V. 42. – P. 419–427.
144. Kwok H. F., So W. K., Wang Y., Ge W. Zebrafish gonadotropins and their receptors: I. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors—evidence for their distinct functions in follicle development // *Biology of Reproduction*. – 2005. – V. 72. – P. 1370–1381.
145. Kwon H.B., Lim Y.K., Choi M.J., Ahn R. S. Spontaneous maturation of follicular oocytes in *Rana dybowskii* in vitro: seasonal influences, progesterone production and involvement of camp // *Journal of Experimental Zoology*. – 1989. – V. 252. – P. 190–199.

146. Kwon S., Abramson T., Munro T. P., John C. M., Köhrmann M., Schnapp B. J. UUCAC- and Veradependent localization of VegT RNA in *Xenopus* oocytes // *Current Biology*. – 2002. – V. 12. – P. 558–564.
147. Lai F., King M. L. Repressive translational control in germ cells // *Molecular Reproduction and Development*. – 2013. – V. 80. – № 8. – P. 665–676.
148. Lai F., Singh A., King M. L. *Xenopus* Nanos1 is required to prevent endoderm gene expression and apoptosis in primordial germ cells // *Development*. – 2012. – V. 139. – P. 1476–1486.
149. Lai F., Zhou Y., Luo X., Fox J., King M. L. Nanos1 functions as a translational repressor in the *Xenopus* germline // *Mechanisms of Development*. – 2011. – V. 128. – № 1-2. – P. 153-163.
150. Landesman Y., Postma F.R., Goodenough D.A., Paul D. L. Multiple connexins contribute to intercellular communication in the *Xenopus* embryo // *Journal of Cell Science*. – 2003. – V. 116. – P. 29–38.
151. Lawson K. A., Dunn N. R., Roelen B. A., Zeinstra L. M., Davis A. M., Wright C. V., Korving J. P., Hogan B. L. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo // *Genes & Development*. – 1999. – V. 13. – № 4. – P. 424–436.
152. Lesch B. J., Page D. C. Genetics of germ cell development // *Nature Reviews Genetics*. – 2012. – V. 13. – P. 781–794.
153. Lewis R. A., Kress T. L., Cote C. A., Gautreau D., Rokop M. E., Mowry K. L. Conserved and clustered RNA recognition sequences are a critical feature of signals directing RNA localization in *Xenopus* oocytes // *Mechanisms of Development*. – 2004. – V. 121. – P. 101–109.
154. Li W., Olofsson J. I., Jeung E. B., Krisinger J., Yuen B. H., Leung P.C. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and cyclic AMP positively regulate inhibin subunit messenger RNA levels in human placental cells // *Life Sciences*. – 1994. – V. 55. – P. 1717–1724.



155. Lin H., Yue L., Spradling A. C. The *Drosophila* fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation // *Development*. – 1994. – V. 120. – P. 947–956.
156. Lin Y.W., Kwon H.B., Petrino T.R., Schuetz A. Studies on the mechanism of action of estradiol in regulating follicular progesterone levels: effects on cAMP mediated events and 3-hydroxysteroid dehydrogenase // *Development, Growth & Differentiation*. – 1988. – V. 30. – P. 611–618.
157. Liu X. S., Ma C., Hamam Al. W., Liu X. J. Transcription dependent and transcription independent functions of the classical progesterone receptor in *Xenopus* ovaries // *Developmental Biology*. – 2005. – V. 283. – P. 180–190.
158. Liu Y., Ren L., Ge L., Cui Q., Cao X., Hou Y., Bai F., Bai G. A strategy for fusion expression and preparation of functional glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue by introducing an enterokinase cleavage site // *Biotechnology Letters*. – 2014. – V. 36. – № 8. – P. 1675–1680.
159. Luque M.E., Serrano M.D., Mónaco M.E., Villecco E.; Sanchez S. Involvement of cAMP and calmodulin in endocytic yolk uptake during *Xenopus laevis* oogenesis // *Zygote*. – 2011. – V. 4. – P. 1–9.
160. Lutz L. B., Cole L. M., Gupta M. K. et al. Evidence that androgens are the primary steroids produced by *Xenopus laevis* ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – V. 98. – № 24. – P. 13728–13733.
161. Lutz L. B., Jamnongjit M., Yang W. H., Jahani D., Gill A., Hammes, S. R. Selective modulation of genomic and nongenomic androgen responses by androgen receptor ligands // *Molecular Endocrinology*. – 2003. – V. 17. – № 6. – P. 1106–1116.
162. MacArthur D. W., King M. L. A critical role for *Xdazl*, a germ plasm-localized RNA, in the differentiation of primordial germ cells in *Xenopus* // *Development*. – 2000b. – V. 127. – P. 447–456.
163. Machado R. J., Moore W., Hames R., Houliston E., Chang P., King M. L., Woodland H. R. *Xenopus* Xpat protein is a major component of germ plasm and

- may function in its organisation and positioning // *Developmental Biology*. – 2005. – V. 287. – № 2. – P. 289-300.
164. Maller J. L., Koontz J.W. A study of the induction of cell division in amphibian oocytes by insulin // *Developmental Biology*. – 1981. – V. 85. – P. 309–316.
165. Marlow F.L., Mullins M.C. Bucky ball functions in Balbiani body assembly and animal-vegetal polarity in the oocyte and follicle cell layer in zebrafish // *Developmental Biology*. – 2008. – V. 321. – P. 40–50.
166. Martinez S., Grandy R., Pasten P., Martinez S., Grandy R., Pasten P. Plasma membrane destination of the classical *Xenopus laevis* progesterone receptor accelerates progesterone induced oocyte maturation // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2006. – V. 99. – № 3. – P. 853–859.
167. Martoriati A., Molinaro C., Marchand G., Fliniaux I., Marin M., Bodart J. F., Takeda-Uchimura Y., Lefebvre T., Dehennaut V., Cailliau K. Follicular cells protect *Xenopus* oocyte from abnormal maturation via integrin signaling downregulation and O-GlcNAcylation control // *Journal of Biological Chemistry*. – 2023. – V. 299. – № 8. – P. 104950.
168. Masui Y. Relative roles of the pituitary, follicle cells, and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens* // *Journal of Experimental Zoology*. – 1967. – V. 166. – P. 365 –376.
169. Mathews D.H., Sabina J., Zuker M., Turner D. H. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure // *J. Mol. Biol.* – 1999. – V. 288. – P. 911–940.
170. Matova N., Cooley L. Comparative aspects of animal oogenesis // *Developmental Biology*. – 2001. – V. 231. – P. 291–320.
171. Maurizii M. G., Cavaliere V., Gamberi C., Lasko P., Gargiulo G., Taddei C. Vasa protein is localized in the germ cells and in the oocyte-associated pyriform follicle cells during early oogenesis in the lizard *Podarcis sicula* // *Development Genes and Evolution*. – 2009. – V. 219. – № 7. – P. 361-367.

172. Mehlmann L.M. Oocyte specific expression of Gpr3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocyte // *Developmental Biology*. – 2005. – V. 288. – № 2. – P. 397–404.
173. Mehlmann L.M., Saeki Y., Tanaka S., Brennan T. J., Evsikov A. V., Pendola F. L., Knowles B. B., Eppig J. J., Jaffe L. A. The Gs linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes // *Science*. – 2004. – V. 306. – № 5703. – P. 1947–1950.
174. Merchant-Larios R., Villalpando I. Ultrastructural events during early gonadal development in *Rana pipiens* and *Xenopus laevis* // *The Anatomical Record*. – 1981. – V. 199. – № 3. – P. 349-360.
175. Messitt T. J., Gagnon J. A., Kreiling J. A., Pratt C. A., Yoon Y. J., Mowry K. L. Multiple kinesin motors coordinate cytoplasmic RNA transport on a subpopulation of microtubules in *Xenopus* oocytes // *Developmental Cell*. – 2008. – V. 15. – P. 426–436.
176. Micklem D. R. mRNA localisation during development // *Developmental Biology*. – 1995. – V. 172. – № 2. – P. 377-395.
177. Miledi R., Woodward R. M. Effects of defolliculation on membrane current responses of *Xenopus* oocytes // *Journal of Physiology London*. – 1989. – V. 416. – P. 601–621.
178. Miwa S., Ya L., Swanson P. Localization of two gonadotropins receptors in the salmon gonad by in vitro ligand autoradiography // *Biology of Reproduction*. – 1994. – V. 50. – P. 629–642.
179. Monaco M. E., VILLECCO E. I., Sánchez S. S. Implication of gap junction coupling in amphibian vitellogenin uptake // *Zygote*. – 2007. – V. 15. – № 2. – P. 149–157.
180. Montorzi M., Falchuk K. H., Vallee B. L. Vitellogenin and lipovitellin: zinc proteins of *Xenopus laevis* oocytes // *Biochemistry*. – 1995. – V. 34. – P. 10851-10858.

181. Morgan M. M., Mahowald A. P. Multiple signaling path-ways establish both the individuation and the polarity of the oocyte-follicle in *Drosophila* // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. – 1996. – V. 33. – P. 211–230.
182. Mosquera L., Forristall C., Zhou Y., King M. L. A mRNA localized to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes encodes a protein with a nanos-like zinc finger domain // *Development*. – 1993. – V. 117. – P. 377–386.
183. Moussatche P., Lyons T. J. Non-genomic progesterone signalling and its non-canonical receptor // *Biochemical Society Transactions*. – 2012. – V. 40(1). – P. 200–204.
184. Mowry K. L., Melton D. A. Vegetal messenger RNA localization directed by a 340-nt RNA sequence element in *Xenopus* oocytes // *Science*. – 1992. – V. 255. – P. 991–994.
185. Mulner O., Ozon R. The roles of follicular envelopes in the initiation of *Xenopus* oocyte maturation // *General and Comparative Endocrinology*. – 1981. – V. 44. – № 3. – P. 335–43.
186. Mulner O., Thibier C., Ozon R. Steroid biosynthesis by ovarian follicles of *Xenopus laevis* in vitro during Oogenesis // *General and Comparative Endocrinology*. – 1978. – V. 34. – P. 287–295.
187. Nader N., Dib M., Courjaret R., Hodeify R., Machaca R., Graumann J., Machaca K. The VLDL receptor regulates membrane progesterone receptor trafficking and non-genomic signaling // *Journal of Cell Science*. – 2018. – V. 131 – № 10. – P. 212522.
188. Nader N., Dib M., Hodeify R., Courjaret R., Elmi A., Hammad A. S., Dey R., Huang X. Y., Machaca K. Membrane progesterone receptor induces meiosis in *Xenopus* oocytes through endocytosis into signaling endosomes and interaction with APPL1 and Akt2 // *PLoS Biol*. – 2021. – V. 18 – № 11. – P. 3000901.
189. Nakamura A., Seydoux G. Less is more: specification of the germline by transcriptional repression // *Development*. – 2008. – V. 135. – P.3817-3827.
190. Nakayama Y., Yamamoto T., Oba Y., Nagahama Y., Abe S. Molecular cloning, functional characterization, and gene expression of a follicle-stimulating

- hormone receptor in the testis of newt *Cynops pyrrhogaster* // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2000. – V. 275. – P. 121–128.
191. Naraine R., Iegorova V., Abaffy P., Franek R., Soukup V., Psenicka M., Sindelka R. Evolutionary conservation of maternal RNA localization in fishes and amphibians revealed by TOMO-Seq // *Developmental Biology*. – 2022. – V. 489. – P. 146-160.
192. Neil C. R., Jeschonek S. P., Cabral S. E., O'Connell L. C., Powrie E. A., Otis J. P., Wood T. R., Mowry K. L. L-bodies are RNA-protein condensates driving RNA localization in *Xenopus* oocytes // *Molecular Biology of the Cell*. – 2021. – V. 32– № 22. – P.37.
193. Nishihara K., Kanemori M., Kitagawa M., Yanagi H., Yura T. Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli* // *Applied and environmental microbiology*. – 1998. – V. 64 – № 5. – P. 1694–1699.
194. Norris R. P., Freudzon M., Mehlmann L. M., Cowan A. E., Simon A. M., Paul D. L., Lampe P. D., Jaffe L. A. Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption // *Development*. – 2008. – V. 135. – P. 3229-3238.
195. Norris R. P., Ratzan W. J., Freudzon M., Mehlmann L. M., Krall J., Movsesian M. A., Wang H., Ke H., Nikolaev V. O., Jaffe L. A. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte // *Development*. – 2009. – V. 136. – P. 1869-1878.
196. O'Brien E. D., Salicioni A. M., Cabada M. O., Arranz S. E. Vitellogenesis in *Bufo arenarum*: identification, characterization and immunolocalization of high molecular mass lipovitellin during oogenesis // *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. – 2010. – V. 155. – № 3. – P. 256–265.

197. Oatley J. M., Griswold M. D. MEIOSIN: A New Watchman of Meiotic Initiation in Mammalian Germ Cells // *Developmental Cell*. – 2020. – V. 52(4). – P. 397-398.
198. Oba Y., Hirai T., Yohiura Y., Kobayashi T., Nagahama Y. Cloning and functional characterization of a gonadotropin receptor cDNA expressed in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1999a. – V. 263. – P. 584–590.
199. Oba Y., Hirai T., Yohiura Y., Yoshikuni M., Kawauchi H., Nagahama Y. The duality of fish gonadotropins receptors: cloning and characterization of a second gonadotropin receptor cDNA expressed in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1999b. – V. 265. – P. 366–371.
200. Ogielska M., Kotusz A. Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in Anuran amphibians // *Journal of Morphology*. – 2004. – V. 259. – P. 41–54.
201. Oh D., Houston D. W. RNA Localization in the Vertebrate Oocyte: Establishment of Oocyte Polarity and Localized mRNA Assemblages // *Results and Problems in Cell Differentiation*. – 2017a. – V. 63. – P. 189-208.
202. Oh D., Houston D. W. Role of maternal *Xenopus* syntabulin in germ plasm aggregation and primordial germ cell specification // *Developmental Biology*. – 2017b. – V. 432. – P. 237–247.
203. Ohlendorf D. H., Barbarash G. R., Trout A., Kent C., Banaszak L. J. Lipid and polypeptide components of the crystalline yolk system from *Xenopus laevis* // *Journal of Biological Chemistry*. – 1977. – V. 252. – P. 7992-8001.
204. Opresko L., Wiley H. S., Wallace R. A. Differential posten docytotic compartmentation in *Xenopus* oocytes is mediated by a specifically bound ligand // *Cell*. – 1980. – V. 22. – P. 47–57.
205. Owens D. A., Butler A. M., Aguero T. H., Newman K. M., Booven D. V., King M. L. High-throughput analysis reveals novel maternal germline RNAs

- crucial for primordial germ cell preservation and proper migration // *Development*. – 2017. – V. 144. – P. 292–304.
206. Panchin Y. Evolution of gap junction proteins – the pannexin alternative // *Journal of Experimental Biology*. – 2005. – V. 208. – P. 1415–1419.
207. Panchin Y., Kelmanson I., Matz M., Lukyanov K., Usman N., Lukyanov S. A ubiquitous family of putative gap junction molecules // *Current Biology*. – 2000. – V.10. – P. 473–R474.
208. Papkoff H., Farmer S. W., Licht P. Isolation and characterization of luteinizing hormone from amphibian (*Rana catesbeiana*) pituitaries // *Life Sciences*. – 1976. – V. 18 – № 2. – P. 245-250.
209. Pepling M. E., de Cuveas M., Spradling A. C. Germline cysts: a conserved phase of germ cells development? // *Trends in Cell Biology*. – 1999. – V. 9. – P. 257–262.
210. Polzonetti-Magni A. M., Mosconi G., Carnevali O., Yamamoto K., Hanaoka Y, Kikuyama S. Gonadotropins and reproductive function in the anuran amphibian, *Rana esculenta* // *Biology of Reproduction*. – 1998. – V. 58. – № 1. – P. 88–93.
211. Polzonetti-Magni A., Carnevali O. A, Yamamoto K., Kikuyama S. Growth Hormone and Prolactin in Amphibian Reproduction // *Zoological Science*. – 1995. – V. 12. – №. 6. – P. 683–694.
212. Ponomarev M. B., Konduktorova V. V., Luchinskaya N. N., Belyavsky A. V Localization of Germes RNA in *Xenopus* Oocytes // *Russian Journal of Developmental Biology*. – 2021. – V. 52. – P. 1–8.
213. Preller A., Kessi E., Ureta T. Glycogen synthesis by the direct or indirect pathways depends on glucose availability: in vivo studies in frog oocytes // *FEBS Letters*. – 2007. – V. 581. – P. 663–666.
214. Racowsky C. Effect of forskolin on the spontaneous maturation and cyclic AMP content of rat oocyte-cumulus complexes // *Journal of reproduction and fertility*. – 1984. – V. 72 – № 1. – P. 107-116.

215. Rand K., Yisraeli J. RNA localization in *Xenopus* oocytes // *Results and Problems in Cell Differentiation*. – 2001. – V. 34. – P. 157-173.
216. Rapali P., García-Mayoral M.F., Martínez-Moreno M., Tárnok K., Schlett K., Albar J. P., Bruix M., Nyitray L., Rodriguez-Crespo I. LC8 dynein light chain (DYNLL1) binds to the C-terminal domain of ATM-interacting protein (ATMIN/ASCIZ) and regulates its subcellular localization // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2011. – V. 414. – № 3. – P. 493–498.
217. Rasar M. A., Hammes S. R. The physiology of the *Xenopus laevis* ovary. *Methods in molecular biology*. – 2006. – V. 322. – P. 17-30.
218. Raz E. Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective // *Nature Reviews Genetics*. – 2003. – V. 4. – P. 690-700.
219. Rebagliati M. R., Dawid I. B. Expression of activin transcripts in follicle cells and oocytes of *Xenopus laevis* // *Developmental Biology*. – 1993. – V. 159 – № 2. – P. 574-80.
220. Rebagliati M. R., Dawid I. B. Expression of activin transcripts in follicle cells and oocytes of *Xenopus laevis* // *Developmental Biology*. – 1993. – V. 159. – P. 574–580.
221. Reddy B. A, Kloc M., Etkin L. D. The cloning and characterization of a localized maternal transcript in *Xenopus laevis* whose zygotic counterpart is detected in the CNS // *Mechanisms of Development*. – 1992. – V. 39 – № 3. – P. 143-150.
222. Redshaw M.R. The hormonal control of the amphibian ovary // *American Zoologist* – 1972. – V. 12. – P. 289–306.
223. Rengaraj D., Zheng Y. H., Kang K. S., Park K. J., Lee B. R., Lee S. I., Choi J. W., Han J. Y. Conserved expression pattern of chicken DAZL in primordial germ cells and germ-line cells // *Theriogenology*. – 2010. – V. 74 – № 5. – P. 765-776.
224. Reynhout J. K., Taddei C., Smith L. D., LaMarca M. J. Response of large oocytes of *Xenopus laevis* to progesterone in vitro in relation to oocyte size and



- time after previous HCG-induced ovulation // *Developmental Biology*. – 1975. – V. 44 – № 2. – P. 375-379.
225. Richter J. D., Smith L. D. Reversible inhibition of translation by *Xenopus* oocyte-specific proteins // *Nature*. – 1984. – V. 309. – P. 378-380.
226. Ríos-Cardona D., Ricardo González R.R., Chawla A., Ferrell J. E. A role for GPRx, a novel GPR3/6/12 related G protein coupled receptor, in the maintenance of meiotic arrest in *Xenopus laevis* oocytes // *Developmental Biology*. – 2008. – V. 317. – №1. – P. 380–388.
227. Robb D. L., Heasman J., Raats J., Wylie C. A kinesin-like protein is required for germ plasm aggregation in *Xenopus* // *Cell*. – 1996. – V. 87. – P. 823–831.
228. Russinova A., Mourdjeva M., Kyurkchiev S., Kehayov I. Immunohistochemical detection of atrial natriuretic factor (ANF) in different ovarian cell types // *Endocrine Regulations*. – 2001. – V. 35 – № 5. – P. 81-89.
229. Sadler S. E., Angleson J. K., Dsouza M. IGF-1 Receptors in *Xenopus laevis* ovarian follicle cells support the oocyte maturation response // *Biology of Reproduction*. – 2010. – V. 82. – P. 591–598.
230. Sandberg K., Bor M., Ji H., Carvallo P. M., Catt K. J. Atrial natriuretic factor activates cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase in *Xenopus laevis* oocytes and potentiates progesterone-induced maturation via cyclic guanosine 5'-monophosphate accumulation // *Biology of Reproduction*. – 1993. – V. 49 – № 5. – P. 1074-82.
231. Sato K. I, Tokmakov A. A. Toward the understanding of biology of oocyte life cycle in *Xenopus Laevis*: No oocytes left behind // *Reproductive Medicine and Biology*. – 2020. – V. 19 – № 2. – P. 114-119.
232. Savage R. M., Danilchik M. V. Dynamics of germ plasm localization and its inhibition by ultraviolet irradiation in early cleavage *Xenopus* embryos // *Developmental Biology*. – 1993. – V. 157. – P. 371–382.

233. Schisa H., Bubunenko M., Houston D. W., King M. L. Xcat2 RNA is a translationally sequestered germ plasm component in *Xenopus* // *Mechanisms of Development*. – 1999. – V. 84 – № 1–2. – P. 75–88.
234. Schisa J. A. New insights into the regulation of RNP granule assembly in oocytes // *International Review of Cell and Molecular Biology*. – 2012. – V. 295. – P. 233–289.
235. Schnapp B. J., Arn E. A., Deshler J. O., Highett M. I. RNA localization in *Xenopus* oocytes // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 1997. – V. 8. – № 6. – P. 529-540.
236. Schonbaum C.P., Perrino J.J., Mahowald A.P. Regulation of the vitellogenin receptor during *Drosophila melanogaster* oogenesis // *Molecular Biology of the Cell*. – 2000. – V. 11 – № 2. – P. 511-521.
237. Schroeder K. E, Yost H. J. *Xenopus* poly (A) binding protein maternal RNA is localized during oogenesis and associated with large complexes in blastula // *Developmental Genetics*. – 1996. – V. 19 – № 3. – P. 268-276.
238. Seervai R. N., Wessel G. M. Lessons for inductive germline determination // *Molecular Reproduction and Development*. – 2013. – V. 80. – № 8. – P. 590-609.
239. Senger P.L. *Pathways to Pregnancy & Parturition*. Redmond, OR: Current Conceptions. – 2012 .
240. Serrano de los M. A., Luque M. E., a Sánchez S. S. Xepac protein and IP3/Ca<sup>2+</sup> pathway implication during *Xenopus laevis* vitellogenesis // *Zygote*. – 2015. – V. 23 – № 1. – P. 99–110.
241. Sheng Y., Montplaisir V., Liu X.J. Cooperation of G $\alpha$  and G $\beta\gamma$  in maintaining G2 arrest in *Xenopus* oocytes // *Journal of Cellular Physiology*. – 2005. – V. 202. – № 1. – P. 32–40.
242. Sheng Y., Tiberi M., Booth R.A., Ma C., Liu X. J. Regulation of *Xenopus* oocyte meiosis arrest by G protein  $\beta\gamma$  subunits // *Current Biology* – 2001. – V. 11. – № 6. – P. 405–416.

243. Sindelka R., Abaffy P., Qu Y., Tomankova S., Sidova M., Naraine R. Kolar M, Peuchen E, Sun L, Dovichi N, Kubista M. Asymmetric distribution of biomolecules of maternal origin in the *Xenopus laevis* egg and their impact on the developmental plan // *Scientific Reports*– 2018. – V. 8. – P. 8315.
244. Smith L. D The role of a “germinal plasm” in the formation of primordial germ cells in *Rana pipiens* // *Developmental Biology*. – 1966. – V. 14. – P. 330–347
245. Smith L. D., Ecker R. E., Subtelny S. In vitro induction of physiological maturation in *Rana pipiens* oocytes removed from their ovarian follicles // *Developmental Biology*. – 1968. – V. 17. – P. 627–643.
246. Smits G., Campillo M., Govaerts C., Janssens V., Richter C., Vassart G., Pardo L., Castagliola S. Glycoprotein hormone receptors: Determinants in leucinerich repeats responsible for ligand specificity // *EMBO Journal* – 2003. – V. 22. – P. 2692–2703.
247. Snapp E. L, Iida T., Frescas D., Lippincott-Schwartz J., Lilly M. A. The fusome mediates intercellular endoplasmic reticulum connectivity in *Drosophila* ovarian cysts // *Molecular Biology of the Cell*. – 2004. – V. 15. – P. 4512–4521.
248. Snedden D. D., Bertke M. M., Vernon D., Huber P. W. RNA localization in *Xenopus* oocytes uses a core group of trans-acting factors irrespective of destination // *RNA*. – 2013. – V. 19 – № 7. – P. 889-95.
249. Sosinsky G. E., Nicholson B. J. Structural organization of gap junction channels // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2005. – V. 1711 – № 2. – P. 99-125.
250. Sretarugsa P., Wallace R. A. The developing *Xenopus* oocyte specifies the type of gonadotropin stimulated steroidogenesis performed by its associated follicle cells // *Development, Growth & Differentiation*. – 1997. – V. 39. – № 1. – P. 87–97.
251. Steegers E. A., Hollanders J. M., Jongsma H. W., Hein P. R. Atrial natriuretic peptide and progesterone in ovarian follicular fluid // *Gynecologic and Obstetric Investigation*– 1990. – V. 29. – № 3. – P. 185-187.

252. Stifani J., Nimpf W. J. Schneider Vitellogenesis in *Xenopus laevis* and chicken: Cognate ligands and oocyte receptor // *Journal of Biological Chemistry*. – 1990. – V. 265. – № 2. – P. 882-888.
253. Swenson K. I., Jordan J. R., Beyer E. C., Paul D. L. Formation of gap junctions by expression of connexins in *Xenopus* oocyte pairs // *Cell*. – 1989. – V. 57. – P. 145-155.
254. Tada H., Mochii M., Orii H., Watanabe K. Ectopic formation of primordial germ cells by transplantation of the germ plasm: Direct evidence for germ cell determinant in *Xenopus* // *Developmental Biology* – 2012. – V. 371. – № 1. – P. 86–93.
255. Taguchi A., Takii M., Motoishi M., Orii H., Mochii M., Watanabe K. Analysis of localization and reorganization of germ plasm in *Xenopus* transgenic line with fluorescence-labeled mitochondria // *Development, Growth & Differentiation*. – 2012. – V. 54. – № 8. – P. 767-776.
256. Tanimura A., Iwasawa H. Ultrastructural Observations on the Origin and Differentiation of Somatic Cells during Gonadal Development in the Frog *Rana nigromaculata*: (frog/gonadal development/sex differentiation) // *Development, Growth & Differentiation*. – 1988. – V. 30. – № 6. – P. 681-691.
257. Tarbashevich K., Koebernick K., Pieler T. TXGRIP2.1 is encoded by a vegetally localizing, maternal mRNA and functions in germ cell development and anteroposterior PGC positioning in *Xenopus laevis* // *Development, Growth & Differentiation*. – 2007. – V. 311. – № 2. – P. 554–565.
258. Tauber D., Tauber G., Parker R. Mechanisms and Regulation of RNA Condensation in RNP Granule Formation // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2020. – V. 45(9). – P. 764-778.
259. Taylor M. A., Robinson K. R. Smith L. D. Intracellular pH and ribosomal protein S6 phosphorylation: role in translational control in *Xenopus* oocytes // *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. – 1985. – V. 89. – P. 35-51.

260. Thibier-Fouchet C., Mulner O., Ozon R. Progesterone biosynthesis and metabolism by ovarian follicles and isolated oocytes *Xenopus laevis* // *Biology of Reproduction*. 1976. V. 14. P. 317–326.
261. Thompson J. R. Banaszak L. J. Lipid-protein interactions in lipovitellin // *Biochemistry*. – 2002. – V. 41. – P. 9398-9409.
262. Thomsen G., Woolf T., Whitman M., Sokoi S., Vaughan J., Vale W., Melton D.A. Activins are expressed early in *Xenopus* embryogenesis and can induce axial mesoderm and anterior structure // *Cell*. – 1990. – V. 63. – P. 485–493.
263. Tian J., Kim S., Heilig E., Ruderman J. V. Identification of XPR1, a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation // *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. – 2000. – V. 97. – № 26. – P. 14358–14363.
264. Tsafiriri A., Chun S.Y., Zhang R., Hsueh A.J.W., Conti, M. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors // *Development, Growth & Differentiation* – 1996. – V. 178. – P. 393–402.
265. Uchiyama H., Nakamura T., Komazaki S., Takio K., Asahima M., Sugino H. Localization of activin and follistatin proteins in the *Xenopus* oocyte // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1994. – V. 202. – P. 484–489.
266. Uribe M. C. A. The ovary and oogenesis // Sever D.M. *Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela*. V. 1. Science Publishers. – 2003. – P. 135–150.
267. Varriale B., Pierantoni R., Di Matteo, Fasano S., D'Antonio M., Chieffi G. Relationship between estradiol 17 beta seasonal profile and annual vitellogenin content of liver, fat body, plasma, and ovary in the frog (*Rana esculenta*) // *General and Comparative Endocrinology*. – 1988. – V. 69. – P. 328–34.

268. Veenstra R. D., Wang H. Z., Beblo D. A., Chilton M. G., Harris A. L., Beyer E. C., Brink P. R. Selectivity of connexin-specific gap junctions does not correlate with channel conductance // *Circulation Research*. – 1995. – V. 77. – P. 1156–1165.
269. Venkatarama T., Lai F., Luo X., Zhou Y., Newman K., King M. L. Repression of zygotic gene expression in the *Xenopus* germline // *Development*. – 2010. – V. 137. – №4. – P. 651-660.
270. Vilain J.P., Moreau M., Guerrier P. Uncoupling of oocytes follicle cells triggers reinitiation of meiosis in amphibian oocytes // *Development, Growth & Differentiation*. – 1980. – V. 22. – P. 687–691.
271. Villecco E. I., Aybar M. J., Genta S. B., Sánchez S. S., Sánchez Riera A. N. Effect of gap junction uncoupling in fullgrown *Bufo arenarum* ovarian follicles: participation of cAMP in meiotic arrest // *Zygote*. – 2000. – V. 8. – P. 171–179.
272. Villecco E. I., Mónaco M. E., Sánchez S. S. Ultrastructural changes in the follicular epithelium of *Ceratophrys cranwelli* previtellogenic oocytes // *Zygote*. – 2007. – V. 15. – № 3. – P. 273–83.
273. Von Stetina J. R., Orr-Weaver T. L. Developmental control of oocyte maturation and egg activation in metazoan models // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2011. – V. 3. – P. 005553.
274. Voronina E., Seydoux G., Sassone-Corsi P., Nagamori I. RNA granules in germ cells // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2011. – V. 3. № 12. – P. 002774.
275. Wahli W., Germond J. E., ten Heggeler B., May F. E. Vitellogenin genes A1 and B1 are linked in the *Xenopus laevis* genome // *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. – 1982. – V. 79. – № 22. – P. 6832–6836.
276. Wallace R. A., Jared D. W., Dumont J. N., Sega M. W. Protein incorporation by isolated amphibian oocytes. 3. Optimum incubation conditions // *Journal of Experimental Zoology*. – 1973. – V. 184. – P. 321–333.
277. Wallace R. A., Selman K. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians // *Journal of electron microscopy technique*. – 1990. – V. 16. – № 3. – P. 175–201.

278. Wallace R., Dumont J.N. The induced synthesis and transport of yolk proteins and their accumulation by the oocyte in *Xenopus laevis* // *Journal of Cellular Physiology*– 1968. – V. 72. – P. 73–89.
279. Wang J., Bing X., Yu K., Tian H., Wang W., Ru, S. Preparation of a polyclonal antibody against goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin and its application to detect the estrogenic effects of monocrotophos pesticide // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2015. – V. 111. – P. 109–116.
280. Wang L. J., Knowland J. Synthesis of vitellogenin in cultures of male and female frog liver regulated by estradiol treatment in vitro // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 1975. – V. 72. – P. 3172–3175.
281. Weeks D. L., Melton D. A. A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere in *Xenopus* eggs codes for a growth factor related to TGF-beta // *Cell*. – 1987b. – V. 51. – P. 861–867.
282. Whittington P. M., Dixon K. E. Quantitative studies of germ plasm and germ cells during early embryogenesis of *Xenopus laevis* // *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. – 1975. – V. 33. – P. 57–74.
283. Wiley H. S., Wallace R. A. The structure of vitellogenin. Multiple vitellogenins in *Xenopus laevis* give rise to multiple forms of the yolk proteins // *Journal of Biochemistry*.– 1981. – V. 256. – P. 8626–8634.
284. Wiley H. S., Wallace R. A. Three different molecular weight forms of the vitellogenin peptide from *Xenopus laevis* // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1978. – V. 85. – P. 153-159.
285. Wylie C. C., Heasman J. The formation of the gonadal ridge in *Xenopus laevis*. I. A light and transmission electron microscope study // *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. – 1976. – V. 35. – P. 125–138.
286. Wylie C. C., Kofron M., Payne C., Anderson R., Hosobuchi M., Joseph E., Heasman J. Maternal beta-catenin establishes a “dorsal signal” in early *Xenopus* embryos // *Development*. – 1996. – V. 122. – P. 2987–2996.
287. Xiang X.; Tao Y., DiRusso, J. Hsu, F.-M.; Zhang J., Xue Z., Pontis J.; Trono D., Liu W., Clark A. T. Human reproduction is regulated by

- retrotransposons derived from ancient hominidae-specific viral infections // Nature Communications – 2022. – V. 13. – P. 463.
288. Yamaguchi S., Hedrick J.L., Katagiri C. The Synthesis and Localization of Envelope Glycoproteins in Oocytes of *Xenopus laevis* using Immunocytochemical Methods. // Development, Growth & Differentiation. – 1989. – V. 31. – № 1. – P. 85-94.
289. Yamaguchi T., Taguchi A., Watanabe K., Orii H. DEADSouth protein localizes to germplasm and is required for the development of primordial germ cells in *Xenopus laevis* // Biology open. – 2013b. – V. 2. – P. 191-199.
290. Yamaguchi T., Taguchi A., Watanabe K., Orii H. Germes is involved in translocation of germ plasm during development of *Xenopus* primordial germ cells // The International Journal of Developmental Biology. – 2013a. – V. 57. – P. 439-443.
291. Yang C., Dominique G. M., Champion M. M., Huber P. W. Remnants of the Balbiani body are required for formation of RNA transport granules in *Xenopus* oocytes // iScience. – 2022. – V. 25. – № 3. – P. 103878.
292. Yang E. J., Nasipa, B. T., Kelley D. B. Direct action of gonadotropin in brain integrates behavioral and reproductive functions // Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. – 2007. – V. 104. – P. 2477–2482.
293. Yang J. C., Hedrick J. L. cDNA cloning and sequence analysis of the *Xenopus laevis* egg envelope glycoprotein gp43 // Development, Growth & Differentiation. – 1997. – V. 39. – P. 457–467.
294. Yang W. H., Lutz L. B., Hammes S. R. *Xenopus laevis* ovarian CYP17 is a highly potent enzyme expressed exclusively in oocytes. Evidence that oocytes play a critical role in *Xenopus* ovarian androgen production // Journal of Biological Chemistry – 2003. – V. 278. – P. 9552–9559.
295. Ying S. Y. Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle stimulating hormone // Endocrine Reviews. – 1988. – V. 9. – P. 267–293.



296. Yisraeli J. K., Sokol S., Melton D. A. A two-step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: Involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of Vg1 mRNA // *Development*. – 1990. – V. 108. – P. 289–298.
297. Yoon Y. J., Mowry K. L. *Xenopus* Staufen is a component of a ribonucleoprotein complex containing Vg1 RNA and kinesin // *Development*. – 2004. – V. 131. – P. 3035–3045.
298. Yoshitome S., Nakamura H., Nakajo N., Okamoto K., Sugimoto I., Kohara H., Kitayama K., Igarashi K., Ito S., Sagata N., Hashimoto E. Mr 25 000 protein, a substrate for protein serine/threonine kinases, is identified as a part of *Xenopus laevis* vitellogenin B1 // *Development, Growth & Differentiation*. – 2003. – V. 45. – P. 283–294.
299. Yoshizaki G., Patiño R. Molecular cloning, tissue distribution, hormonal control in the ovary of Cx41 mRNA, a novel *Xenopus* connexin gene transcript // *Molecular Reproduction and Development*. – 1995. – V. 42. – P. 7–18.
300. Yoshizaki N. In vivo study of vitellogenin-gold transport in the ovarian follicle and oocyte of *Xenopus laevis* // *Development, Growth & Differentiation*. – 1992. – V. 34. – P. 517-527.
301. Yoshizaki N., Yonezawa S. Cathepsin D Activity in the Vitellogenesis of *Xenopus laevis* // *Development Growth and Regeneration*. – 2008. – V. 36 – № 3. – P. 299 – 306.
302. Yoshizaki N., Yonezawa S. Cathepsin D Activity in the Vitellogenesis of *Xenopus laevis*: (*Xenopus*/ oocyte/ vitellogenin cleavage/ cathepsin D/ immunohistochemistry) // *Development, Growth & Differentiation*. – 1994. – V. 36. – № 3. – P. 299-306.
303. Zearfoss N. R., Chan A. P., Kloc M., Allen L. H., Etkin L. D. Identification of new Xlsirt family members in the *Xenopus laevis* oocyte // *Mechanisms of Development*. – 2003. – V. 120. – P. 503–509.

304. Zelarayán L. I., Ajmat M. T., Bonilla F., Bühler M. I. Involvement of G protein and purines in *Rhinella arenarum* oocyte maturation // *Zygote*. – 2012. – V. 2. – P. 1–10.
305. Zelarayan L., Oterino J., Bühler M.I. Spontaneous maturation in *Bufo arenarum* oocytes: follicle wall involvement, respiratory activity and seasonal influences // *Journal of Experimental Zoology*. – 1995. – V. 272. – P. 356–62.
306. Zhang M., Tao Y., Zhou B., Xie H., Wang F., Lei L., Huo L., Sun Q., Xia G. Action of ANP in meiotic maturation of pig oocytes // *Journal of Molecular Endocrinology*. – 2005. – V. 34. – P. 459–472.
307. Zhou Y., King M. L. RNA transport to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes // *Development, Growth & Differentiation*. – 1996. – V. 179. – P. 173–183.
308. Zhu Y, Rice C. D, Pang Y., Pace M., Thomas P. Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – V. 100. – № 5. – P. 2231–2236.
309. Zuccotti M., Merico V., Cecconi S., Redi C. A, Garagna S: What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? // *Human Reproduction Update* – 2011. – V. 17. – P. 525–540.
310. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // *Nucleic Acids Research*. – 2003. – V. 31. – P. 3406–3415.
311. Zust B., Dixon K. E. The effect of u.v. irradiation of the vegetal pole of *Xenopus laevis* eggs on the presumptive primordial germ cells // *Journal of embryology and experimental morphology*. – 1975. – V. 34. – P. 209–220.
312. Берекеля Л. А., Пономарев М. Б., Микрюков А. А., Лучинская Н. Н., Белявский А. В. Молекулярные механизмы детерминации клеток зародышевого пути у животных // *Молекулярная биология*. – 2055. – Т. 39. – № 4. – С. 664-677.
313. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки // Изд. Мир, – 1976г, – 368 с.

314. Скоблина М.Н. Участие щелевых контактов в стимуляции созревания ооцитов травяной лягушки *in vitro* низкими концентрациями прогестерона // Онтогенез. – 2004. – Т. 35. – № 5. – С. 350–355.