

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*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

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

Москва – 2024

Диссертация подготовлена на кафедре эмбриологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

- Научный руководитель** – **Никишин Денис Александрович**, кандидат биологических наук
- Официальные оппоненты** – **Вершинин Владимир Леонидович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией функциональной экологии наземных животных Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт экологии растений и животных Уральского отделения РАН»
- Егоров Егор Евгеньевич** – доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН»
- Ерошкин Федор Михайлович**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «19» марта 2024 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.9 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М-1

E-mail: [tlipina@mail.ru](mailto:tlipina@mail.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.9/2878>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Т. В. Липина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** 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. С их помощью в ооците были идентифицированы локализованные и распределенные матричные 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 также способствуют расширению наших знаний о фундаментальных процессах фолликулогенеза шпорцевой лягушки.

**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 взаимовлияния 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 взаимовлияний 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.

**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**:

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

**Объект и предмет исследования.** Основной объект исследования данной работы – шпорцевая лягушка *Xenopus laevis* (Daudin). В экспериментах использовали ооциты, а также эмбрионы различных стадий развития. *X. laevis* является лабораторным видом и содержится на кафедре эмбриологии МГУ. В исследовании 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. Предметом настоящей работы стало исследование продуктов гена *germes* в оогенезе и раннем развитии шпорцевой лягушки, а также их распространенности среди других амфибий.

**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 гаметогенеза.

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, но и также в окружающих фолликулярных клетках. 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 клетках, что важно для построения целостной картины формирования половой линии при детерминационном пути. Результаты работы открывают перспективы для дальнейших исследований в этой области.

**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.

**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, мечеными коллоидным золотом. Содержание и локализация белка исследованы 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.

**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.

По результатам работы сделано 6 докладов на российских и международных конференциях.

**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.

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

**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.

**Положения, выносимые на защиту.**

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

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы

**Объекты исследования.** Объектом исследования служили шпорцевые лягушки *Xenopus laevis* (Daudin), содержащиеся на кафедре эмбриологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова. В экспериментах использовали ооциты, а также зародыши на последовательных стадиях раннего развития. Для филогенетического исследования распространенности гена среди других групп амфибий были использованы малая шпорцевая лягушка *Silurana (Xenopus) tropicalis*, жаба *Bufo Bufo*, травяная лягушка *Rana temporaria*, жерлянка *Bombina bombina*, а также малая когтистая лягушка *Hymenochirus boettgeri*. Лягушки были определены до вида по ключу [Terent'ev, Chernov, 1965].

Ооциты разных стадий были выделены вручную диссекцией из яичников самок *X. laevis*, *X. tropicalis*, *H. Boettgeri*, *R. Temporaria*, *B. Bufo*, *B. bombina*. Отделение фолликулярных оболочек от ооцитов *X. laevis* стадий I–III проводили в растворе коллагеназы (2 µg/ml) на горизонтальном шейкере

2–3 часа при 37°C. Оболочки ооцитов V–VI стадии (50–70 шт.) отделяли вручную с помощью пинцетов в растворе MMR (2x - NaCl). Эмбрионы *X. laevis* получали путем оплодотворения зрелых ооцитов *in vitro*.

**Получение и очистка антител.** Сыворотку, содержащую поликлональные антитела против Germes, получили после 5 этапов инъекций белых новозеландских кроликов согласно стандартному протоколу [Wang et al., 2015] хроматографически очищенным рекомбинантным белком. Для получения рекомбинантного белка использовалась укороченная растворимая последовательность гена (125 а. к.), которая была клонирована в экспрессионный вектор с GST пептидом. Иммунная сыворотка была проверена на специфичность с помощью Вестерн-блоттинга. Поликлональные антитела очищались путем связывания на PVDF мембране с бактериальным рекомбинантным белком His-Germes, а затем связавшиеся АТ элюировали кислым глицином.

**Гибридизация *in situ* с окраской ультратонких срезов антителами, мечеными коллоидным золотом.** Окраску проводили схожим образом, как описано ранее в работе Билинского (Bilinski et al., 2010). Фолликулы разных стадий фиксировали 2 ч в растворе: 4% формальдегид, 0,1% глутаральдегид, 100 mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 150 mM сахароза, 0,1% Triton X-100 pH 7.6. Переводили в 96% этанол. Далее регидратировали в понижающих концентрациях этанола (75%, 50% и 25%), 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, а после в течение ночи гибридизацию с 0.5 мкг синтезированного *in vitro* антисмыслового РНК-зонда. Отмывки фолликулов выполняли раствором 2xSSC/0,3% CHAPS (1:1 и 1:4) по 10 минут при 50°C, 2 раза по 20 минут при 37°C. После инкубировали с 20 мкг/мл РНКазы в том же растворе при 37°C 20 минут, 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 50°C, в PBS-0,25% Triton X-100 10 минут, в PBS-0,05% Tween 20 2 раза по 5 минут. Фолликулы после *in situ* гибридизации с зондом против *germes*, заключали в эпоновую смесь. Изготавливали ультратонкие срезы, которые затем окрашивали антителами против дигоксигенина, содержащими коллоидное золото. 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).



**Конфокальная микроскопия.** Для иммуноцитохимического анализа связки ооцитов разных стадий фиксировали в смеси метанол/1% формальдегид при  $-20^{\circ}\text{C}$  2 ч. Затем нагревали до комнатной температуры и последовательно переводили в раствор PBS по 30 минут каждый шаг (70% метанол:30% PBS, 30% метанол:70% PBS), обрабатывали 0,25% Triton X-100 30 минут и отмывали раствором PBS при  $+4^{\circ}\text{C}$ . Блокировали раствором 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. Окраску вторичными флюоресцентными антителами и отмывку проводили также, как с первичными. Анализ окрашенных образцов проводили с помощью конфокального микроскопа Leica SP5 или Olympus FluoView FV10i.

**ПЦР в реальном времени.** С помощью ПЦР-РВ оценивались относительные уровни экспрессии мРНК в раннем развитии шпорцевой лягушки, а также ооцитах и их фолликулярных оболочках. Исследования ПЦР-РВ проводили с использованием амплификатора 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Относительные уровни экспрессии (RQ) рассчитывали с помощью метода  $\Delta\Delta\text{Ct}$  (Bookout et al., 2005), в качестве референсного гена использовали ODC. Накопление продукта реакции регистрировалось прибором с использованием флуоресцентного красителя qPCR-HS SYBR+LowROX.

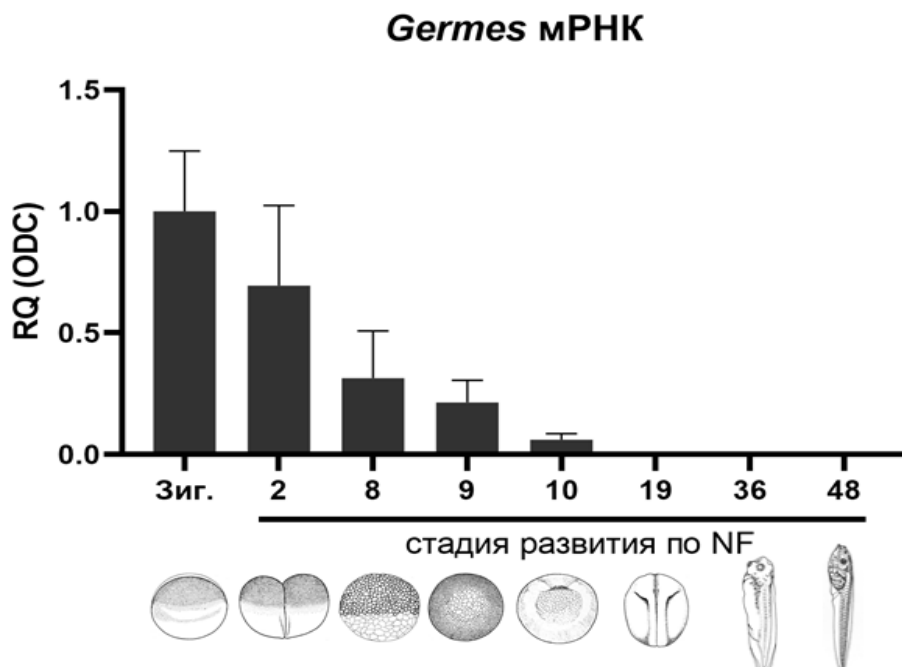
## Результаты и обсуждение

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

Для оценки начала экспрессии *germes* методом гибридизации *in situ* с зондом против мРНК проведен анализ распределения транскриптов этого гена в гонадах самок *X. laevis* вскоре после метаморфоза (стадии 65–66). Транскрипты *germes* выявляются в яичнике, формируя проксимально-дистальный градиент распределения в ооцитах I-II порядка. Оогонии не окрашиваются зондом против *germes*. 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). Небольшое количество мРНК сохраняет равномерное распределение по всему объёму цитоплазмы на этих стадиях.

Внутриклеточное распределение мРНК *germes* в ооцитах проанализировано с использованием *in situ* гибридизации с окраской ультратонких срезов антителами, мечеными наночастицами золота (рис. 6). Золотая метка выявлена по всему объёму малых ооцитов стадии II, в том

числе в околядерной области (рис. 6). 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. 6).

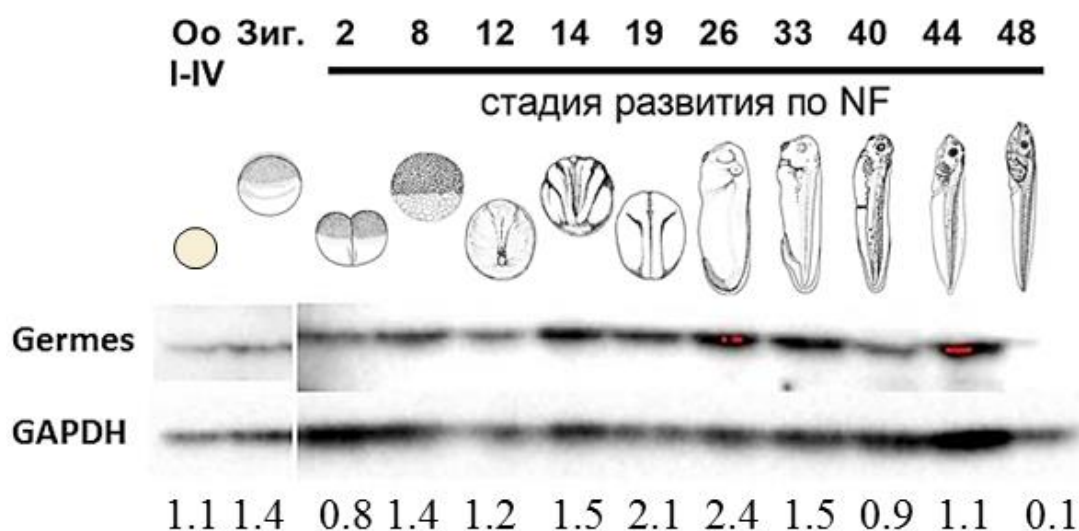


**Рисунок 1.** Динамика экспрессии мРНК *germes* в ходе эмбрионального развития *X. laevis*. Значения относительных уровней экспрессии (RQ) получены методом ОТ-ПЦР в реальном времени и рассчитывались методом  $\Delta\Delta C_t$ . В качестве референсного гена использовали *odc*. Экспрессия в зиготе принята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

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. 1). Экспрессия мРНК *germes* максимальна на стадии зиготы (уровень экспрессии принят за 100%), после чего постепенно уменьшается к стадии нейрулы. На стадии нейрулы (ст. 19) количество материнского транскрипта находится на минимально детектируемом уровне 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.

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 их самостоятельно. Для анализа содержания белка в оогенезе и эмбриогенезе

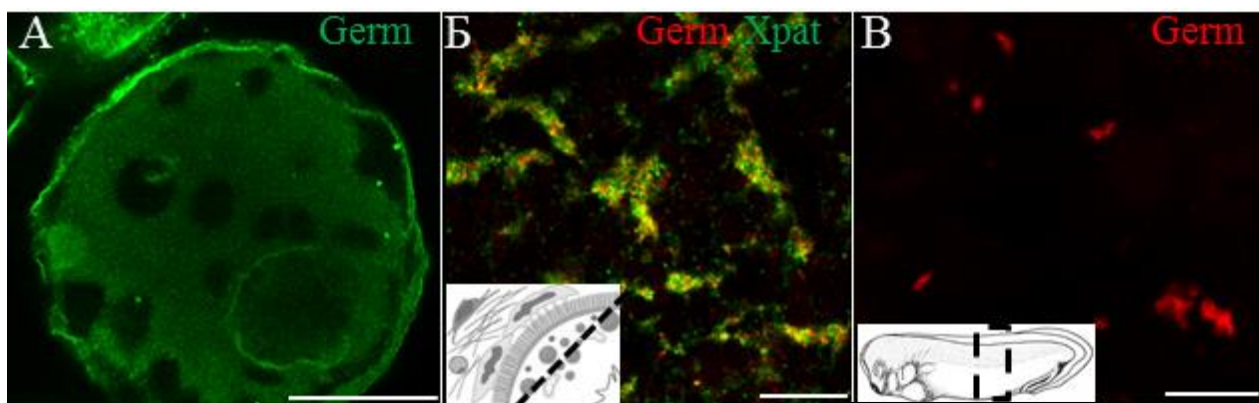
Germes методом Вестерн-блоттинга были отобраны маленькие прозрачные ооциты ранних стадий роста (I-IV) и начала вителлогенеза (III-IV) из яичников лягушат в возрасте 5-6 месяцев после метаморфоза, а зрелые полноразмерные ооциты V-VI стадии – из взрослых половозрелых лягушек. Для анализа содержания белка в ходе эмбрионального развития после оплодотворения *in vitro* были отобраны основные стадии раннего развития: зигота, дробление (стадии 2, 8), гаструляция (стадия 12), нейруляция (стадии 14, 19), хвостовая почка (стадии 26, 33), головастика (стадии 40, 44, 48). Показано, что на ранних этапах оогенеза (стадии I-IV) белок Germes содержится в том же количестве, что и в зрелых ооцитах на стадии VI (рис. 2).



**Рисунок 2.** Анализ содержания белка Germes в ооцитах и эмбрионах *X. laevis*. Методом Вестерн-блоттинга. 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.

Анализ содержания белка Germes в эмбриогенезе показал, что белок остается на одном уровне в зиготе, в период дробления, гаструляции и нейруляции (рис. 2). 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. Наблюдаются колебания значений содержания белка Germes от стадии к стадии, это объясняется различным количеством формирующихся половых клеток в каждом отдельно взятом организме (20-50 шт). 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 к стадии 48. Отметим, что присутствие белка Germes в развитии наблюдается гораздо дольше, по сравнению с быстро деградирующей после оплодотворения мРНК.

С помощью полученных антител удалось оценить не только наличие белка в развитии, но и выяснить его локализацию. Для иммуноцитохимического 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. 3). Окрашивание ооцитов стадий большого роста (V–VI) антителами против *Germes* также выявило характерные островки ПП. Причем, если провести параллельное иммуноокрашивание фолликулов антителами против другого маркера ПП *Xpat*, то наблюдается колокализация белков в островках ПП (рис. 3). Визуализация белка иммуноцитохимическим методом подтверждает, что белок начинает транслироваться сразу с началом малого роста ооцитов и сохраняется весь оогенез. По нашим данным, белок *Germes* также меняет свою локализацию в течение оогенеза, вероятно, благодаря направленному транспорту на вегетативный полюс. 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 на основании наших данных пока невозможно.

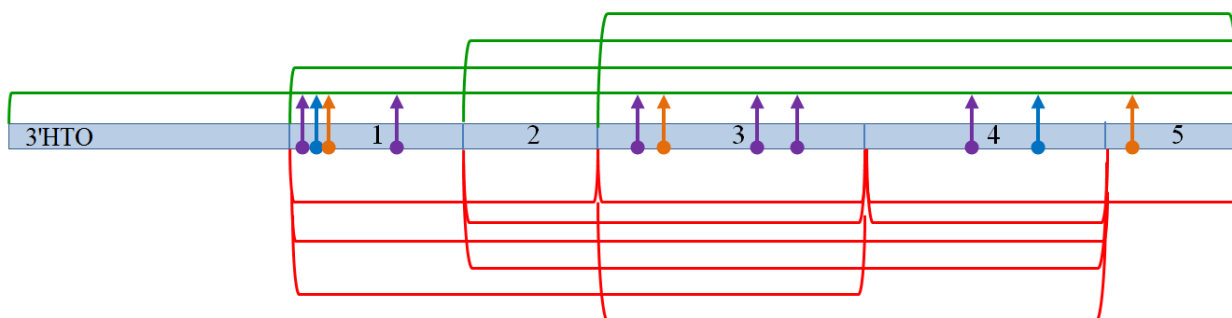


**Рисунок 3.** Иммуноокрашивание на белок *Germes* ооцитов. (А) Ооцит ст. I окрашен равномерно; (Б) Ооцит ст. VI. Белок *Germes* локализован в островках ПП вегетативного полюса. Иммуноокрашивание на *Xpat* (зеленый), *Germes* (красный), колокализация (желтый). (В) Иммуноокрашивание на белок *Germes* зародышей выявляет группу мигрирующих первичных половых клеток (z-stack). Масштабные отрезки: А 25 мкм, Б 10 мкм, В 15 мкм. Пунктирной линией на схеме обозначена плоскость среза или интересующая область.

Иммуноокрашивание эмбрионов на стадии хвостовой почки (29–32) против белка *Germes* выявляет группу первичных половых клеток на боковой поверхности. Результаты иммуноцитохимического анализа зародышей свидетельствуют, что белок меняет свое распределение и в развитии, локализуясь в ППК. Это также подтверждает предыдущий вывод о наличии белка в раннем развитии *X.laevis*. На контрасте с быстро деградирующей материнской РНК белок сохраняется значительно дольше. Скорее всего, он

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

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



**Рисунок 4.** 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).

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 с помощью программы REPFIND на предмет наличия известных мотивов, необходимых для доставки в определенные компартменты клетки или специфического связывания с другими белками. Анализ выявил повторы из тринадцати САС мотивов отдельно и в различных сочетаниях с другими нуклеотидами (САСТ, САСТТТ, САСТТ, САСТГ). Также в последовательности 3'НТО были обнаружены мотивы MCLC, VM1 и E2 (рис. 4). Показано, что мотивы MCLC и E2 необходимы для РНК, локализующихся на вегетативный полюс с использованием как раннего, так и позднего пути. Также в 3'НТО *germes* найдена последовательность мотива, названного Vg1 Motif 1. Он участвует во взаимодействии с белком Vg1RBP [Betley et al., 2002]. Показано для многих РНК, что он необходим для локализации РНК как по раннему, так и позднему пути. Таким образом, в 3'НТО *germes* были обнаружены мотивы, вероятно, необходимые для локализации, как в МО (ранний путь), так и для направленного транспорта на вегетативный полюс ооцита (поздний). Однако судя по результатам *in situ* гибридизации, основным является механизм раннего пути.

Вторичные и третичные структуры РНК, в том числе и в 3'НТО, также могут являться важными и необходимыми для транспортировки и локализации РНК. Последовательность 3'НТО *germes* была проанализирована программой MFOLD, предсказывающей вторичные структуры РНК. Предсказанная вторичная структура была условно разделена на 5 частей. 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 в ооциты I-II стадии флуоресцентных РНК этих конструкторов, 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. 4). 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. 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 расположение мотивов MCLC, VM1 и E2 на последовательности фрагментов, можно заключить, что минимальная локализуемая область 3-5 3'НТО РНК *germes* содержит все три мотива. Количество повторов САС в области 3-5 также довольно высокое – 10 из 15 всей последовательности 3'НТО.

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%. Хотя белок в своем составе имеет две лейциновые молнии (с 356 аминокислоты, LSFRPIGLFSTTSLLSNDLSFL, 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.

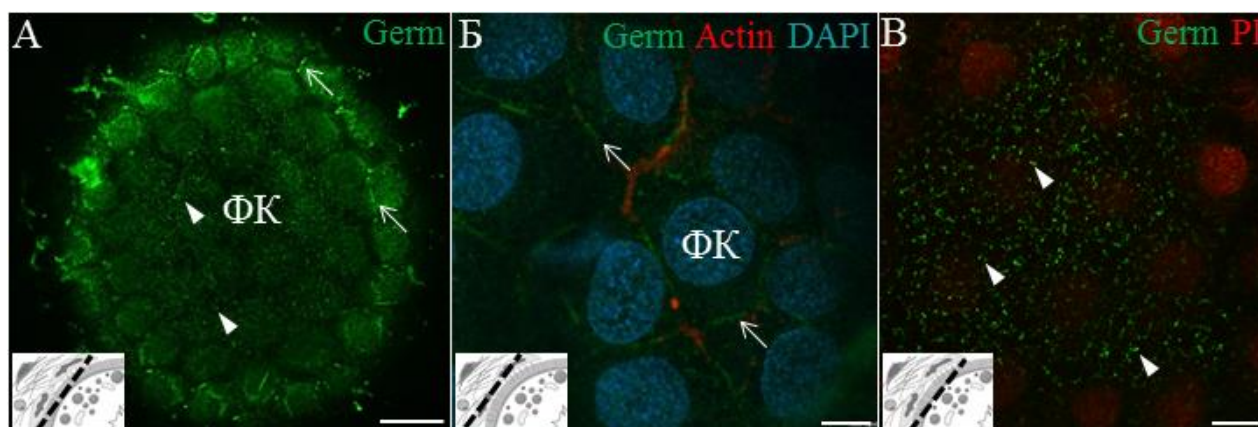
#### ***Продукты гена *germes* в фолликулярных клетках ооцита.***

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. Между ооцитом и ФК осуществляется транспорт веществ посредством щелевых контактов, которые расположены на микровиллях и макровиллях соответственно. Они пронизывают желточную оболочку навстречу друг другу.

Белок *Germes*, выявленный нашими антителами, визуализируется в ФК в виде линейных структур длиной около 5,5 мкм в контактных зонах соседних ФК. Такие, не описанные ранее структуры, выявлялись в ФК как больших, так и малых ооцитов (рис. 5). Белок *Germes* сходным образом выявляется также в макровиллях (рис. 5). ФК имеют 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.

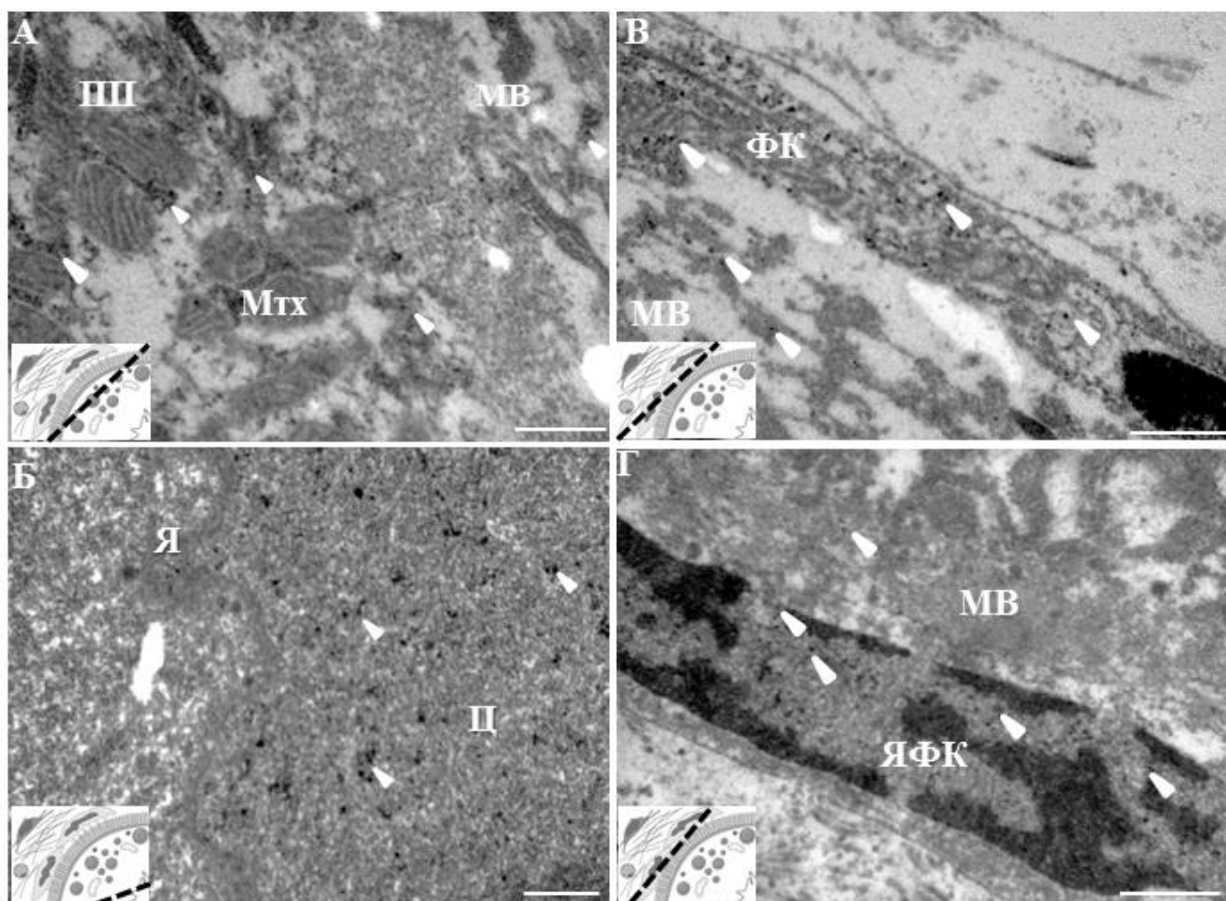


**Рисунок 5.** Иммуноокрашивание фолликулярных клеток антителами против белка *Germes*. (А, Б, В) Ооцит стадии V–VI. (А, Б) Оптический срез фолликулярных клеток. Белок *Germes* (зеленый) обнаруживается в виде линейных структур в контактных зонах соседних фолликулярных клеток (острая стрелка), где колокализуется с F-актином (phalloidin-красный); ядра окрашены DAPI (голубой), а также в области макровилл (треугольная стрелка). (В) Макровилли на поверхности фолликулярных клеток, обращенной к ооциту, содержат *Germes*. Ядра окрашены прогидиум йодиде (PI-красный). ФК – фолликулярные клетки. Масштабные отрезки: (А) 25, (В) 10, (Б) 5 мкм. Пунктирной линией на схеме обозначена плоскость среза.

Следующей закономерной задачей было исследовать наличие мРНК *germes* в ФК. Для качественного анализа наличия РНК использовался метод *in situ* гибридизации с использованием зонда, меченного 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. Крупницы коллоидного золота были обнаружены внутри ФК больших и малых фолликулов, причем не только в цитоплазме, но и ядре (рис. 6). 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.

#### ***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), с которых отделяли оболочки. Тонкие оболочки ФК (вместе с текой) ооцитов V–VI стадий снимали пинцетами под контролем стереомикроскопа, а ФК ооцитов малого роста с помощью раствора коллагеназы в течение 2-3 часов.



**Рисунок 6.** Гибридизация *in situ* с зондом к мРНК *germes* с окраской ультратонких срезов антителами, меченными наночастицами золота.

(А) Транскрипт-Аu – в половой плазме (ПП) и макровиллях (МВ) вегетативного полюса ооцита стадии VI. Мтх- митохондрии. (Б) Транскрипт-Аu в околядерной цитоплазме малого ооцита стадии II в процессе формирования митохондриального облака. (В, Г) Фолликулярная оболочка ооцита стадии VI. Транскрипт-Аu в цитоплазме фолликулярной клетки (ФК) и макровиллях (МВ) (В), а также в ядре (ЯФК). Масштабный отрезок: - 0.5 мкм. Пунктирной линией на схеме обозначена плоскость среза.

При помощи метода ПЦР-РВ было подтверждено наличие мРНК *germes* в ФК (рис. 7), причем удельное количество транскрипта в ФК малых стадий ооцитов превышало количество в самих ооцитах примерно в 4 раза. А содержание мРНК в ФК больших фолликулов было сопоставимо с уровнем в ооцитах V–VI стадий. Заметно, что количество РНК как в ооците, так и в ФК с ростом ооцита падает. Таким образом, двумя разными методами было подтверждено наличие транскрипта *germes* в фолликулярной оболочке, имеющей соматическое происхождение.

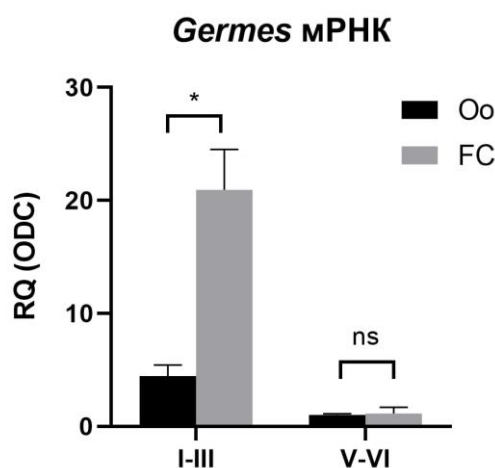
#### **Транскрипция гена *germes* в фолликулярных клетках**

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.

Для поиска непротранскрибированной формы мРНК с помощью ПЦР был выбран интрон длиной 152 п. н (рис. 8). В ооцитах I–II стадий мы обнаружили непротранскрибированную мРНК, что было ожидаемо, поскольку транскрипт, появляясь на самых ранних стадиях оогенеза, использует ранний путь локализации, а затем лишь сохраняется в кортексе вегетативного полюса. В ФК больших и малых фолликулов нами было показано наличие несплайсированной мРНК, что доказало экспрессию *germes* в них на протяжении всего оогенеза (рис. 8).

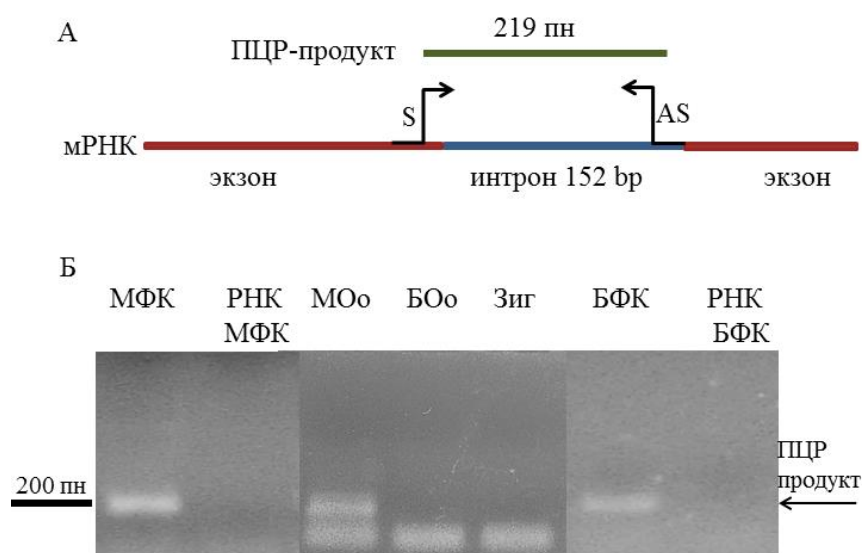


**Рисунок 7.** Относительные уровни экспрессии (RQ) мРНК *germes* в ооцитах и фолликулярных клетках, полученные с помощью ПЦР-РВ.

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.

У амфибий фолликулярные клетки сообщаются с ооцитом посредством щелевых контактов, через которые не могут проходить большие молекулы. Поэтому экспрессия *germes* в половых и соматических клетках фолликула, вероятнее всего, независима. И белок выполняет, скорее всего, разные функции в клетках половой и соматической линии. Функция белка для поддержания образования ППК частично известна. Для ФК роль *Germes* еще предстоит исследовать. Однако для ФК функции, связанные с процессом транспорта, являются ключевыми, поскольку множество работ показывают их необходимое участие во время роста и созревания ооцита. В последовательности белка *Germes* имеются лейциновые молнии, которые могут участвовать в связывании с другими белковыми партнерами как в ПП, так и в ФК. Белок *Germes*, выявленный 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 посредством миристоилирования. В этом случае белок способен взаимодействовать с плазматической мембраной, 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.



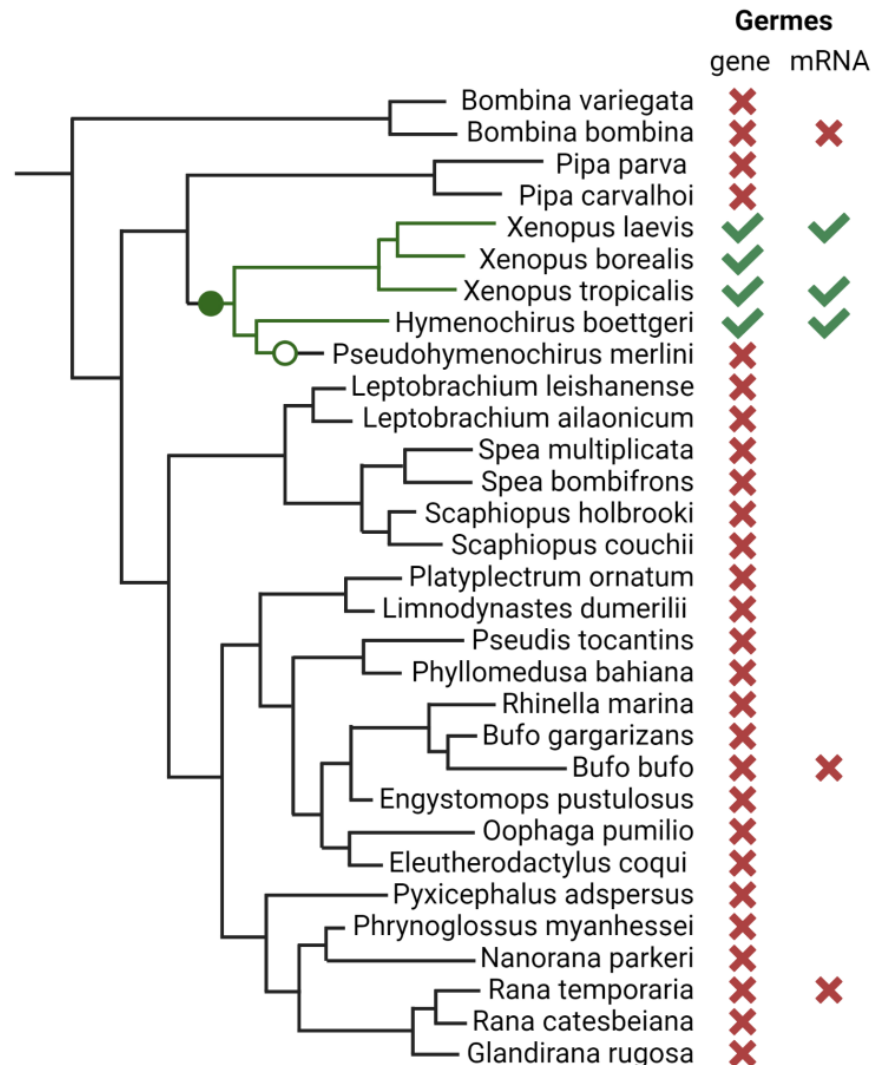
**Рисунок 8.** Выявление непроцессированной мРНК *germes* в ооцитах и фолликулярных клетках с них с помощью ПЦР.

(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.

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

*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. Среди аннотированных нуклеотидных последовательностей базы данных NCBI была найдена предсказанная последовательность мРНК близкого вида того же рода *Xenopus tropicalis* (XM\_031898982.1). Далее, в геномах Anura, доступных в базе данных NCBI, была выявлена гомологичная последовательность *germes* у когтистой лягушки *Xenopus borealis* (CM044435), а также у малой когтистой лягушки *Hymenochirus boettgeri*. *H. boettgeri* принадлежит к семейству Pipidae, как и три представителя рода

*Xenopus* (рис.9). 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. 9).



**Рисунок 9.** 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/taxonomy/AW_FamilyPhylogeny.html) ([https://amphibiaweb.org/taxonomy/AW\\_FamilyPhylogeny.html](https://amphibiaweb.org/taxonomy/AW_FamilyPhylogeny.html)).

Полученные биоинформатические результаты были подтверждены путем исследования экспрессии ортологов *germes* в тканях яичников некоторых представителей бесхвостых амфибий. Присутствие короткого консервативного участка *germes* (150 п. н.) было проанализировано в транскриптомах яичников у шести видов Anura: *Xenopus laevis*, *Xenopus tropicalis*, *Hymenochirus boettgeri*, *Rana temporaria*, *Bufo bufo* и *Bombina bombina*. Таким образом, были амплифицированы, клонированы и

секвенированы короткие последовательности не только *X. laevis*, *X. tropicalis*, но и *H. boettgeri*. Однако ПЦР-анализ экспрессии гомологов *germes* *R. temporaria*, *B. bufo* и *B. bombina* не выявил гомологичных последовательностей, подтвердив результаты биоинформатического анализа.

Согласно нашим результатам, *germes* встречается только в семействе Pipidae. Гомолог гена и транскрипт *germes* были обнаружены только у видов, принадлежащих к родам *Xenopus* и *Hymenochirus* (рис. 9). Множественный анализ последовательности белка Germes у четырех видов амфибий показал, что наибольшая гомология наблюдается между *X. laevis* и *X. borealis*, которые является филогенетически самыми близкими друг к другу (рис. 9). 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. Можно заключить, что ген *germes* возник в пределах семейства Pipidae, а позднее был утрачен в одной из линий, к которой относится род *Pseudhymenochirus* (рис. 9).

Поскольку показано негативное воздействие мутантной формы белка, лишенной LZ доменов, на формирование и миграцию ППК [Berekelya et al., 2007], мы также сравнили последовательность этого мотива у четырех видов амфибий. По нашим результатам, консенсусная последовательность лейциновой молнии остается более-менее неизменной. Поскольку лейциновые молнии участвуют в белок-белковых взаимодействиях, то, скорее всего, они необходимы белку для выполнения его схожих функций в обнаруженных видах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования распределения продуктов гена *germes* в фолликулогенезе и раннем развитии *X. laevis* помогают лучше понять процесс формирования зародышевой линии, поскольку ген 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.

## 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 3'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*, но не выявляется в геноме *Pseudhymenochirus merlini*.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова:

- 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. — N. 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. — N. 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. — N. 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. — N. 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.