На правах рукописи

ИЛЬИЧЕВА Надежда Викторовна

БЕЛКИ ЭКСТРАХРОМОСОМНЫХ КОМПОНЕНТОВ КАРИОСФЕРЫ И РНК ЯДЕР ООЦИТОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ КАРИОСФЕРЫ С КАПСУЛОЙ

03.01.03 – Молекулярная биология

ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

> Санкт-Петербург 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии Российской академии наук

Научный руководитель:	доктор биологических наук, профессор Подгорная Ольга Игоревна заведующий группой некодирующей ДНК Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург		
Официальные оппоненты:	Доктор биологических наук, профессор Родионов Александр Викентьевич заведующий лабораторией биосистематики и цитологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанический институт имени В.Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург		
	Кандидат биологических наук Сайфитдинова Алсу Фаритовна, доцент кафедры анатомии и физиологии человека и животных Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена», Санкт-Петербург		
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск		

Защита диссертации состоится 31 мая 2019 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4.

Сайт института: http://www.incras.ru Адрес электронной почты института: cellbio@incras.ru Факс института: (812) 297-35-41 С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте http://www.incras.ru Автореферат разослан « » 2019 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета, кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

<u>Актуальность</u>

В ядрах ооцитов многих животных на поздних стадиях развития (стадия диплотены профазы I деления мейоза) хроматин принимает особую конфигурацию, называемую кариосферой. Кариосфера представляет собой результат концентрации всех хромосом ооцита в определенном, небольшом объеме ядра. Ядро ооцита во время формирования кариосферы характеризуется значительным снижением синтетической активности, причем у одних организмов транскрипция полностью прекращается, а у других сохраняется остаточная транскрипция хроматина. Хотя стадия хромосом – ламповых щеток, часто предшествующая образованию кариосферы, получила широкое освещение в литературе (обзоры Callan, 1986; Gaginskaya et al., 2009), самой кариосфере уделено гораздо меньше внимания (Bogolyubov, 2018).

Функциональное значение кариосферы пока не ясно; вероятно, объединение хромосом в небольшом объеме крупного ядра ооцита необходимо для правильного протекания последующих мейотических делений (Грузова и др., 1995; Wu et al., 2008). Большое практическое значение имеет прояснение вопроса о том, как влияет наличие кариосферы у млекопитающих на способность ооцитов формировать жизнеспособные эмбрионы. Установлено, что у многих млекопитающих, включая человека, ооциты с кариосферой обладают бо́льшим потенциалом к развитию (Luciano, Lodde, 2013).

Кариосфера часто ассоциирована с различными экстрахромосомными структурами. У некоторых видов вокруг кариосферы образуется волокнистая капсула, отделяющая хромосомы от остальной нуклеоплазмы. Такая организация кариосферы характерна для ооцитов некоторых насекомых и травяной лягушки Rana temporaria. У других видов, например, у многих млекопитающих и птиц, конденсированные хромосомы окружают центральное тело (ЦТ). У млекопитающих ЦТ представляет собой дериват ядрышка и в литературе называется ядрышкоподобным телом или постъядрышком, а у птиц оно образуется в результате слияния белковых тел, ассоциированных с хромосомами – ламповыми щетками (ЛЩ). Определение состава экстрахромосомных компонентов кариосферы является предметом настоящей работы и, мы надеемся, приблизит к пониманию их функций.

Большой интерес представляет изучение состава РНК ядер ооцитов на поздних стадиях оогенеза. В это время в ядре могут накапливаться регуляторные транскрипты, необходимые для придания будущей зиготе тотипотентности и для последующего эмбрионального развития. Выяснение природы и функций этих транскриптов имеет фундаментальное значение для биологии развития.

Цель и задачи исследования

Цель настоящей работы – определить некоторые белки экстрахромосомных компонентов кариосферы мыши и травяной лягушки, а также проанализировать РНК ядер поздних вителлогенных ооцитов травяной лягушки.

Задачи:

1) с помощью метода иммуноцитохимии исследовать белковый состав ЦТ кариосферы мыши и капсулы кариосферы (КК) травяной лягушки *R. temporaria*;

2) определить транскрипционную активность ядер ооцитов *R. temporaria* после микроинъекций модифицированного нуклеотидтрифосфата BrUTP;

3) определить влияние деполимеризации актиновых филаментов на структуру КК и транскрипцию в ооцитах *R. temporaria*;

4) провести анализ РНК ядер ооцитов *R. temporaria* с помощью высокопроизводительного секвенирования и биоинформатической обработки данных.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В составе ЦТ ооцитов мыши и КК травяной лягушки обнаружены ламины А и В типов. Актин и топоизомераза II (TopoII) присутствуют в КК *R. temporaria*, но отсутствуют в ЦТ кариосферы мыши. В составе КК также обнаружены нуклеопорины Nup93 и Nup35, хроматинремоделирующий белок ATRX и компоненты малых ядерных (мя) РНП. Белок TRF2 колокализуется с белком SC35 в ядерных спеклах ооцитов мыши на 1-й и 2-й стадиях формирования кариосферы; затем перемещается в ЦТ. В ооцитах лягушки TRF2 находится в ядерных спеклах на 6-й стадии развития наряду с ядерной мембраной.

2. На 5-й стадии развития ооцита *R. temporaria* имеет место остаточная транскрипция хроматина, на 6-й стадии транскрипция отсутствует.

3. Актиновые филаменты являются структурным каркасом капсулы кариосферы, способствуют правильной организации хромосом в составе кариосферы, а также компонентов капсулы кариосферы – ядрышек и волокнистых структур. Деполимеризация F-актина не приводит к прекращению транскрипции.

4. В аннотированной части транскриптома ядра поздних ооцитов *R. temporaria* обнаружены в значительном количестве тандемные повторы, некоторые классы мобильных элементов, гены рРНК и малые РНК. В сборке транскриптома предсказаны 5 новых тандемных повторов, из них 3 с высокой вероятностью.

Научная новизна. Впервые получены данные о присутствии ламинов и TRF2 в ЦТ ооцитов мыши и о присутствии ATRX, топоизомеразы II, нуклеопоринов, актина, ламинов в КК *R. temporaria*. Исследовано влияние деполимеризации F-актина на структуру КК и транскрипцию в поздних ооцитах *R. temporaria*. Впервые установлено, что актиновые филаменты составляют структурный каркас КК. Впервые показано отсутствие транскрипции в ооцитах *R. temporaria* на 6-й стадии развития. Впервые проведен анализ транскриптома поздних ооцитов *R. temporaria*; обнаружены транскрипты ранее неизвестных тандемных повторов.

Теоретическое и практическое значение работы. Работа имеет фундаментальную направленность и вносит вклад в понимание процессов оогенеза. Результаты белковом работы дополняют представления 0 составе экстрахромосомных компонентов кариосферы мыши и травяной лягушки. Данные об РНК-составе ядра ооцита травяной лягушки на поздних этапах оогенеза важны для понимания роли некодирующих РНК в оогенезе. Расширены представления о роли актиновых филаментов в поддержании структуры капсулы кариосферы травяной лягушки. Материалы диссертации используются в курсах лекций для бакалавров и магистров Биологического факультета СПбГУ и могут быть использованы в общих и специальных курсах лекций биологических факультетов других университетов.

<u>Апробация работы</u>. Результаты работы были представлены на 19 Международной Пущинской школе- конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (Пущино, 2015), V и VI молодежных конференциях по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2016, 2018), XVII Конференции-школе с международным участием «Актуальные проблемы биологии развития» (Москва, 2016), Международной конференции «Biomembranes 2016: Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases» (Долгопрудный, 2016), 25th Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus (Nizhny Novgorod, 2017), Конференции «Клеточная биология: проблемы и перспективы» (Санкт-Петербург, 2017), XVIII Всероссийском симпозиуме с международным участием «Структура и функции клеточного ядра» (Санкт-Петербург, 2018).

<u>Финансовая поддержка работы</u>. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты 15-04-01857, 16-34-00714), РНФ (проект 15-15-20026) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых журналах и 7 тезисов.

Личный вклад автора. Основные результаты получены автором лично. Опыты по иммунофлуоресцентному окрашиванию ооцитов проводили совместно с Г.Н. Почукалиной. Опыты по выделению РНК проводили совместно с Л.С. Адониным. Биоинформатический анализ выполнен совместно с Д.И. Остромышенским.

<u>Объем и структура диссертации</u>. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования, обсуждения, выводов и списка литературы, содержащего 219 ссылок на первоисточники. Работа изложена на 115 страницах, содержит 30 рисунков и 6 таблиц.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

<u>Объектом исследования</u> служили ооциты лягушки *Rana temporaria* 5-й и 6-й стадий развития (Duryee, 1950) и преовуляторные ооциты мыши. В работе использовали самок лягушек возрастом от 3 лет и мышей линии BALB/с возрастом 1–2 мес. Лягушек брали из естественной среды обитания (Ленинградская обл.) и содержали при 4°C в течение периода гибернации с ноября по апрель.

Выделение и очистка рекомбинантного udTRF2. Проводили экспрессию белка udTRF2 в культуре *Escherichia coli* RosettaBlue (DE3) pET32a–udTRF2 в следующих условиях: время культивирования 2,5 ч, концентрация индуктора экспрессии изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) 0,4 мМ, температура 37°С. Белок выделяли из растворимой фракции лизата бактерий с помощью ступенчатого осаждения сульфатом аммония и ионообменной хроматографии.

<u>Получение поликлональных антител (AT).</u> Для иммунизации использовали морских свинок (самцы, вес 400–500 г, возраст 3–4 мес). За 1 нед до иммунизации у животных брали преиммунную сыворотку. Раствор, содержащий 20 мкг белка udTRF2, смешивали с адъювантом Фрейнда (MP Biomedicals, CША) в соотношении 1:3 и вводили животным 3 раза с перерывом 8–10 сут подкожно или внутримышечно. Через 10 сут после последней инъекции у животных брали кровь и выделяли иммунную сыворотку, для чего образцы крови инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин, затем центрифугировали при 10 000 g 10 мин.

<u>Электрофорез в SDS-ПААГ и иммуноблоттинг.</u> Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ) с добавлением SDS проводили согласно стандартной методике (Laemmly, 1970). Концентрация акриламида в разделяющем геле составляла 10–14% в зависимости от молекулярной массы белков. Для окраски

гелей использовали краситель Кумасси G250. Для проведения иммуноблоттинга белки после электрофоретического разделения переносили на мембрану PVDF методом полусухого переноса. Мембрану инкубировали в растворе 5%-ного сухого обезжиренного молока на PBS–Tween, а затем в растворах первичных и вторичных AT, конъюгированных со щелочной фосфатазой. Выявление связавшихся с антигеном AT проводили в системе BCIP–NBT.

<u>Культуры клеток</u>. В работе использовали культуру фибробластов кожи человека. Клетки культивировали на среде DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки, 4,5 г/л глюкозы, 4 мМ глутамина, 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Для пересева клетки промывали раствором Версена и снимали с подложки с помощью раствора трипсина.

Проверка АТ методом иммуно-FISH. Клетки фиксировали в 2%-ном формальдегиде при 4°C в течение 20 мин, промывали 1× PBS и инкубировали в 3%ном растворе BSA для устранения неспецифичных сайтов связывания. Препараты инкубировали в растворе первичных АТ (иммунная сыворотка в разведении 1:200) во влажной камере 16 ч при 4°C, затем отмывали от не связавшихся с антигеном АТ в PBS и инкубировали в растворе вторичных АТ, конъюгированных с Alexa-488 1 ч при комнатной температуре. После отмывки в PBS для проведения гибридизации in situ (FISH) препараты дополнительно фиксировали в 2%-ном формальдегиде при 4°С 20 мин, обрабатывали РНКазой А (0,1 мг/мл) и дегидратировали в серии спиртов (70, 90, 96%-ный этанол). Для гибридизации использовали меченый биотином двухцепочечный теломерный зонд размером 300-1000 п.н. Зонд и препарат денатурировали в 70%-ном формамиде на 2× SSC с 10% декстрансульфата при 80°С в течение 5 мин, а затем гибридизовали при 37°С 16 ч. Препараты промывали в 45%-ном формамиде на 2× SSC при 42°C 5 мин, а затем – в SSC 2×5 мин, после чего инкубировали в растворе стрептавидина, $2 \times$ конъюгированного с Alexa-568, в разведении 1:200 в течение 1 ч. Препараты заключали в среду Antifade gold с добавлением DAPI (Molecular probes) и исследовали с помощью конфокального микроскопа LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss).

<u>Выделение ооцитов мыши.</u> Яичники мыши промывали PBS, помещали в фиксатор (4%-ный формальдегид на PBS) и выделяли ооциты, прокалывая антральные фолликулы титановой иглой. Ооциты промывали 0,1%-ным Triton X-100 на PBS.

Выделение ядер ооцитов лягушек. После извлечения яичники лягушек хранили в буфере OR2 (82,5 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ Na₂HPO₄, 5 мМ HEPES, pH 7,6). Фрагменты яичника переносили в буфер «5:1» (83 мМ KCl, 17 мМ NaCl, 6,5 мМ Na₂HPO₄, 3,5 мМ KH₂PO₄), ядра выделяли с помощью пинцета и титановой иглы. После выделения ядра отмывали от желтка в буфере «5:1» с добавлением 0,05% Triton X-100. Для разделения ядер на оболочки и внутреннюю часть ядра инкубировали в растворе «5:1» с добавлением 1 мМ CaCl₂ в течение 30 мин, оболочки снимали с помощью титановых игл. Для иммуноцитохимии ядра фиксировали в 4%-ном формальдегиде на PBS с добавлением 0,2% Triton X-100 в течение 40 мин при комнатной температуре.

<u>Иммуноцитохимия.</u> Ооциты мыши или ядра ооцитов лягушки инкубировали в 10%-ной фетальной сыворотке крупного рогатого скота на PBS, промывали в трех сменах PBS и инкубировали в растворе первичных АТ в течение ночи при 4°C. Список использованных в работе АТ приведен в табл. 1.

	Таблица 1.	Первичные	антитела,	использованные	в работе
--	------------	-----------	-----------	----------------	----------

	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Антиген	Антитело	Распознаваемый эпитоп
Lamin B	Sc6217 (Santa Cruz)	С-конец
Lamin A	Ab8980 (Abcam)	Аминокислотные остатки 598-611
Lamin C	Ab8981 (Abcam)	Последние 8 аминокислотных остатков на С-
		конце
Actin	Millipore; MAB1501R	Аминокислотные остатки 50-70 в составе S2-
		субдомена
Actin	Sigma, cat. No. A2103	Первые 9 аминокислотных остатков на С-
		конце
Actin	Sigma, cat. No. A2066	Последние 8 аминокислотных остатков на С-
		конце
ATRX	sc-15408 (Santa Cruz)	Аминокислотные остатки 2193-2492 на С-
		конце
TopoII	AV04007 (Sigma)	С-конец
TRF2	ab4182 (Abcam)	Аминокислотные остатки 207-307
TRF2	Anti-udTRF2 (Ilicheva	Аминокислотные остатки 245-445
	et al., 2018a)	
Nup93	sc-374399 (Santa Cruz)	Аминокислотные остатки 1–300 на N-конце
Nup35	sc-74762 (Santa Cruz)	Nup35 (внутренняя область)
H3K9met3	Ab8898 (Abcam)	Аминокислотные остатки 1–100 на N-конце
SC35	S4045 (Sigma)	Фосфоэпитоп SC35
Sm-белки	Y12 (Lerner et al.,	Симметричные диметиларгинины Sm-белков
	1981)	
мяРНК	K121 (Krainer et al.,	Триметилгуанозиновый (ТМС) кэп
	1988)	
BrUTP	клон BU-33, Sigma	BrUTP, BrdU

Препараты отмывали от первичных АТ в PBS 4×10 мин и инкубировали в растворе вторичных АТ, конъюгированных с Alexa-488, -568 или -633. Препараты отмывали в условиях, указанных выше, и заключали в среду Vectashield (Vector Laboratories), содержащую 1 мкг/мл DAPI. Препараты исследовали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS SP5, оборудованного аргоновым (488 нм) и гелий-неоновыми (543, 633 нм) лазерами.

<u>Обработка цитохалазином Д</u>. Фрагменты яичников помещали в буфер OR2 с добавлением 4 мкМ цитохалазина Д (ЦД) и инкубировали в течение 3–4 ч при комнатной температуре. После инкубации проводили микроинъекции BrUTP или выделяли ядра для последующей окраски АТ или TRITC-фаллоидином.

Выявление F-актина с помощью TRITC-фаллоидина. Ядра ооцитов лягушек выделяли и фиксировали, промывали в трех сменах PBS и инкубировали в растворе TRITC-фаллоидина (10 мкг/мл) во влажной камере 1 ч при комнатной температуре. Ядра промывали в четырех сменах PBS по 10 мин каждая и заключали в среду Vectashield с 1 мкг/мл DAPI.

<u>Микроинъекции BrUTP.</u> Ооциты отделяли от яичника и помещали в буфер OR2. В каждый ооцит с помощью микроинъектора вводили 18,4 нл раствора BrUTP (100 мМ BrUTP, 140 мМ KCl, 2 мМ PIPES, pH 7,4). Ооциты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Ядра выделяли, промывали, фиксировали и окрашивали AT к BrUTP в разведении 1:600, как описано выше. В качестве контроля перед обработкой AT ядра помещали в PBS, содержащий 20 мкг/мл РНКазы A на 1 ч.

Выделение хроматин-ассоциированной фракции РНК и синтез кДНК. Ядра ооцитов лягушек с небольшим количеством цитоплазмы разделяли на цитоплазматическую (Цт), нуклеоплазменную (Нп) и хроматин-ассоциированную (Х-ас) фракции. Для этого 400-500 ядер с небольшим количеством цитоплазмы суспендировали в лизирующем буфере (Sol 1) (0,15% NP-40, 10 мМ Tris pH 7,5, 150 мМ NaCl) и инкубировали 10 мин при 0°С, лизат наслаивали на подушку из 500 мкл буфера Sol 2 (10 мМ Tris pH 7,5, 150 мМ NaCl, 24% сахарозы) и центрифугировали при 14 000 g и 4°C 10 мин. Из супернатанта выделяли Цт-фракцию РНК. Осадок суспендировали в 250 мкл буфера Sol 3 (20 мМ Tris pH 7,9, 75 мМ NaCl, 0,5 мМ EDTA, 50% глицерина, 0,85 мМ DTT), добавляли 250 мкл буфера Sol 4 (20 мМ HEPES pH 7,6, 7,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ EDTA, 0,3 M NaCl, 1 М мочевина, 1% NP-40, 1 мМ DTT), перемешивали, инкубировали 1 мин при 0°С. Пробу центрифугировали при 14 000 g и 4°C 2 мин, из супернатанта выделяли Нп-фракцию РНК, осадок суспендировали в 50 мкл PBS и выделяли Х-ас-фракцию РНК. РНК из фракций выделяли с помощью кислого фенола (Chomczynski, Sacchi, 1987). кДНК набора Mint-2 синтезировали с помощью (Евроген) согласно протоколу производителя.

ДНК–РНК FISH. Для приготовления зондов использовали кЛНК. синтезированную на матрице РНК Цт-, Нп- и Х-ас-фракций РНК ооцитов лягушек. Зонды синтезировали методом ПЦР. Состав смеси для ПЦР: праймер М1 (5 пМ на реакцию), смесь dNTP (по 0,2 мM dATP, dCTP, dGTP, 0,07 мM dTTP, 0,14 мM dUTP, конъюгированного с биотином), Таq-полимераза (1 ед. на реакцию), 1× Таqбуфер, ddH₂0 до 20 мкл. Программа для ПЦР: 95°С 1 мин – 1 цикл; 94°С 1 мин, 66°С 20 с, 72°С 1 мин – 30 циклов. После ПЦР в пробы добавляли 0,1 объема 3 М ацетата калия (рН 5) и 0,7 объема изопропанола, пробы инкубировали 30 мин при – 20°С, центрифугировали при 10 000 g 10 мин для осаждения ДНК. Зонды сушили в эксикаторе, растворяли в 100%-ном формамиде, денатурировали при 80°С 10 мин и помещали в лед. Затем к зондам добавляли равный объем буфера для гибридизации (4× SSC, 10 мМ EDTA, 10% декстран-сульфата, 300 мкг/мл ДНК спермы лосося, 15 ед/мл ингибитора РНКазы). Ядра ооцитов лягушек фиксировали в 4%-ном формальдегиде на 1× PBS с 1% Triton X-100 1,5 ч при 4°С, затем – в 2%-ном ПФА на 1× PBS с 0,1% Triton X-100 16 ч при 4°С. После фиксации ядра обезвоживали в серии спиртов (30, 50, 70 и 96%-ный этанол) и хранили в 96%-ном этаноле при 4°С в течение 1-2 нед. Непосредственно перед гибридизацией ядра регидрировали в серии спиртов (70, 50, 30%-ный этанол) и промывали 2×5 мин в 2× SSC. В качестве контроля порцию ядер обрабатывали РНКазой в концентрации 10 мкг/мл на 2× SSC 1 ч. Препараты обрабатывали проназой (40 мкг/мл) 20 мин, промывали 2× SSC 2×5 мин, фиксировали в 4%-ном формальдегиде на 1× PBS 30 мин, промывали 2× SSC 2×5 мин и инкубировали в 50%-ном формамиде на $2 \times SSC 1$ ч. Раствор формамида удаляли, к ядрам добавляли по 20 мкл заранее подготовленного зонда и инкубировали во влажной камере при 37°С 16 ч. Ядра промывали в 50%-ном формамиде на $2 \times SSC 2 \times 10$ мин и в $2 \times SSC 2 \times 10$ мин при комнатной температуре. Ядра инкубировали в блокирующем растворе (Vector Laboratories) 30 мин и в растворе стрептавидин–Alexa-546 в разведении 1:300 1 ч. Препараты промывали 4× SSC 3×10 мин и заключали в среду Vectashield (Vector Laboratories) с DAPI (1мкг/мл).

Секвенирование и биоинформатический анализ. Для секвенирования использована РНК ядер ооцитов лягушки (РНК нуклеоплазмы и КК). Библиотека для секвенирования приготовлена с использованием NEBNext® DNA Library Prep Kit. Секвенирование проведено на платформе Illumina MiSeq с парным прочтением ридов длиной 150х2 п.н. в компании Novogen. Провели очистку исходных ридов по методике, изложенной ниже. Анализ качества ридов проводили с помощью программы FASTQC (https://www.bioinformatics.babraham. ac.uk/projects/fastqc/). Обрабатывали риды помощью программы Trimmomatic с (http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic): удаляли риды, содержащие технические последовательности Illumina, риды со средним качеством чтения (PHRED-score) ниже 20, первые и последние 20 п. н. для каждого рида. В дальнейшем анализе использовали только оставшиеся парные риды. Для поиска канонических k-mer (k 31) использовали программу Jelyfish = (http://www.genome.umd.edu/jellyfish.html). При этом обнаружили сильное обогащение ридов каноническими 31-mer с низкой информационной энтропией (A)×31 и (CA)×14.5. Удалили риды, содержащие (A)×31 и (CA)×14,5 в любых возможных вариантах (точное совпадение, комплементарная последовательность, обратная комплементарная последовательность, обратная последовательность). Сборку транскриптома проводили с помощью программы Trinity на платформе Galaxy (www.usegalaxy.org) с параметрами по умолчанию. Определяли уровень экспресии с помощью программы Salmon. Транскрипты с наибольшим уровнем экспресии аннотировали с помощью BLAST. Для поиска известных повторов собранные транскрипты анализировали с помощью RepeatMasker (http://www.repeatmasker.org/). Новые тандемные повторы (TП) и мобильные элементы (transposable elements, ТЕ) искали среди очищенных ридов с использованием программ RepeatExplorer (http://repeatexplorer.org/) и TAREAN (Novák et al., 2017). Запуск указанных программ проводили на платформе Galaxy на сайте https://repeatexplorer-elixir.cerit-sc.cz/galaxy/. Для поиска ТП и ТЕ в исходных ридах использовали 500 тыс. парных ридов, выбранных случайным образом, что соответствует 0,02× покрытию генома *R. temporaria* и находится в рамках, рекомендуемых разработчиками указанных программ.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Получение антител к udTRF2-домену теломер-связывающего белка TRF2

В диплотенных ооцитах травяной лягушки теломеры отделены от ядерной оболочки, а хромосомы собраны в центре ядра. Благодаря крупным размерам ядер ооцитов лягушки (около 0,6 мм в диаметре), их можно вручную разделить на ядерную оболочку и нуклеоплазму. Ранее с помощью метода ретардации с теломерной ДНК в экстракте ядерных оболочек был обнаружен теломерсвязывающий белок (Bugaeva, Podgornaya, 1997; Podgornaya et al, 2000), который оказался ортологом белка TRF2 (Bilaud et al., 1996). Между димеризационным и ДНК-связывающим доменами TRF2 находится ликерная область – udTRF2-домен (рис. 1А), функции которой в настоящее время неизвестны. Получены косвенные данные, свидетельствующие о том, что этот домен может отвечать за взаимодействие TRF2 с ядерной оболочкой (Voronin et al., 2003). Фрагмент гена *TERF2*, кодирующий udTRF2-домен, клонирован в вектор pET32a (рис. 1Б), экспрессию рекомбинантного белка проводили В бактериях Е. coli RosettaBlue(DE3). Белок выделяли из лизата бактерий и использовали для получения АТ (рис. 1В).



Рис. 1. Получение рекомбинантного udTRF2-домена теломер-связывающего белка TRF2. А. Доменная структура белка TRF2. GAR – N-концевой глицин-аргининовый-домен; TRFH – гомодимеризационный домен; Myb – С-концевой ДНК-связывающий Myb-домен. Б. Карта плазмиды pET32a–udTRF2. В. Электрофорез лизатов индуцированной и контрольной культур бактерий *E. coli* RosettaBlue (DE3)-pET32a–udTRF2 и белка udTRF2 в SDS–ПААГ. 1 – маркер молекулярного веса белков; 2 – лизат индуцированной культуры, на электрофореграмме отчетливо виден белок 25 кДа, соответствующий по массе udTRF2; 3 – лизат контрольной культуры; 4 – очищенный белок udTRF2.

Для получения поликлональных АТ рекомбинантный белок вводили морским свинкам, у которых затем брали кровь и выделяли иммунную сыворотку, которую проверяли на наличие АТ методом иммуноблоттинга. Для проверки использовали лизат индуцированной и контрольной бактериальных культур, а также лизат культуры фибробластов человека (рис. 2А). В качестве контроля использовали коммерческие поликлональные АТ (ab4182, Abcam). Эти АТ получены к аминокислотной последовательности, которая частично перекрывается с udTRF2 и включает часть гомодимеризационного домена TRFH. AT anti-udTRF2 распознают белок с молекулярной массой 30 кДа в лизатах индуцированной и контрольной культур, а также белок с молекулярной массой 25 кДа в лизате индуцированной бактериальной культуры. Масса этого белка соответствует молекулярной массе udTRF2, определяемой по электрофорезу в SDS-ПААГ. АТ к TRF2 (Abcam) распознают белок udTRF2 в лизате индуцированной культуры. Для проверки способности AT anti-udTRF2 связываться с полноразмерным TRF2 ИЗ фибробластов кожи эукариотических клеток использовали лизат человека. Оказалось, что АТ связывают белок с молекулярной массой около 69 кДа, что соответствует кажущейся молекулярной массе белка TRF2, определяемой по электрофорезу в SDS-ПААГ (Ilicheva et al., 2018а). АТ протестированы методом иммуноблоттинга на препаратах ядерных оболочек и внутреннего содержимого ядер ооцитов лягушки (рис. 2Б). Для сравнения проводили иммуноблоттинг с коммерческими AT к TRF2 (Abcam). На рисунке видно, что на препарате ядерных оболочек АТ к udTRF2 проявляют большую специфичность, чем коммерческие АТ (Ilicheva et al., 2018b). АТ распознают TRF2 в ядерной оболочке ооцита, а также другие более высокомолекулярные изоформы белка во внутренней части ядер.



Рис. 2. Тестирование АТ anti-udTRF2 методами иммуноблоттинга и иммуно-FISH. А. Иммуноблоттинг бактериальных белков лизатов и лизата культуры фибробластов человека. К лизат контрольной бактериальной культуры; И лизат индуцированной бактериальной культуры, ФБЧ – лизат фибробластов кожи человека: Б. Иммуноблоттинг белков ядер ооцитов R. temporaria с AT anti-TRF2 (Abcam) и antiudTRF2. ЯО – лизат ядерных оболочек; BH лизат внутреннего содержимого ядер. B.

Иммунофлуоресцентное окрашивание фибробластов человека AT anti-udTRF2 (зеленый), совмещенное с FISH с теломерным зондом (красный). Масштабная линия 5 мкм.

Чтобы проверить способность полученных АТ связываться с нативным TRF2 в клетках, проводили иммунофлуоресцентное окрашивание фибробластов кожи человека, совмещенное с флуоресцентной гибридизацией in situ (иммуно-FISH) использовали двухцепочечный теломерный (рис. 2В). Для FISH ДНК-зонд 200 - 1000п.н. Сигнал от зонда, маркирующего размером теломеры, колокализовался с сигналом от AT anti-udTRF2. Следовательно, AT anti-udTRF2 можно применять для исследования локализации TRF2 в клетках методом иммуноцитохимии.

3.2 Белки экстрахромосомных компонентов кариосферы

Исследовали локализацию некоторых белков в ЦТ ооцитов мыши и КК травяной лягушки. Для идентификации белков использовали метод непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии. При выборе АТ руководствовались данными по морфологии исследуемых структур и результатами иммунохимических исследований капсулы кариосферы некоторых насекомых (Bogoliubov et al., 2013).

Выделили 3 стадии формирования кариосферы в ооцитах мыши в соответствии с общепринятой классификацией (Bouniol-Baly et al., 1999) (рис. 3). На 1-й стадии ЦТ расположено в центральной части ядра, а хроматин находится в деконденсированном состоянии, при этом отчетливо видны хромоцентры – типичные для клеток мыши скопления гетерохроматина. На 2-й стадии хроматин начинает группироваться вокруг ЦТ. На 3-й стадии ЦТ смещается к периферии ядра, а хроматин окружает ЦТ и находится в максимально конденсированном для этого этапа развития состоянии.



Рис. 3. Стадии формирования кариосферы В ядре мыши. ооцитов 1-я стадия (Non-surrounded nucleolus, NSN): хроматин находится преимущественно в деконденсированном

состоянии; 2-я стадия (partly Surrounded Nucleolus, pSN): хроматин начинает конденсироваться и частично собирается вокруг ЦТ, 3-я стадия (Surrounded Nucleolus, SN): конденсированный хроматин окружает ЦТ, что соответствует кариосфере. Окраска DAPI.

Капсула кариосферы *R. temporaria* состоит из волокнистого компонента, в который включены амплифицированные ядрышки. В настоящей работе исследован молекулярный состав КК травяной лягушки на 5-й и 6-й стадиях оогенеза (Duryee, 1950). На 5-й стадии конденсированные хромосомы собраны в кариосферу, которая ещё не достигает максимальной степени компактизации, хорошо заметны отдельные биваленты. На 6-й стадии хромосомы собираются в плотный клубок (рис. 4).



Рис. 4. Общий вид кариосферы травяной лягушки на 5-й и 6-й стадиях развития ооцита (окраска DAPI). Масштабная линия 50 мкм.

Ультраструктурные исследования (Chouinard, 1971; Gruzova, Parfenov, 1977) показали, что в состав ЦТ и КК входит фибриллярный материал. Мы предположили, что в состав ЦТ и КК могут входить структурные белки ядерного матрикса, такие как актин и белки ядерной оболочки, а также белки, связанные с ремоделированием и компактизацией хроматина.

<u>Ламины</u> относятся к промежуточным филаментам и составляют каркас ядерной оболочки. По биохимическим свойствам выделяют ламины А- и В-типов. Для идентификации ламинов в ооцитах мыши использовали АТ к ламинам A и B1. Оба типа ламинов обнаружены нами в ЦТ. Ламин A на 1-й стадии находится в ядерной оболочке, а на 3-й стадии локализуется в ЦТ. Ламин В присутствует в ЦТ на всех трех стадиях формирования кариосферы, а также колокализуется с хромоцентрами. При этом, в отличие от ламина A, значительная часть ламина B остается в ядерной оболочке (Pochukalina, Ilicheva et al., 2016). Для выявления ламинов в КК ооцитов лягушки использовали АТ к ламинам A, B1 и ламину C, который является сплайс-вариантом ламина A. В КК обнаружены все типы ламинов, причем они локализованы в волокнистом компоненте на обеих стадиях, не затрагивая ядрышки. Все три белка присутствуют в ядерной оболочке, которая была использована в качестве контроля (Ильичева и др., 2016). **TRF2.** Теломер-связывающий белок TRF2 был обнаружен ранее в ядерной оболочке ооцита травяной лягушки (Podgornaya et al., 2000). Показано прямое взаимодействие TRF2 с ламином A в клетках человека (Wood et al., 2014). В преовуляторных ооцитах мыши нами обнаружено необычное распределение белка TRF2: на всех трех стадиях развития кариосферы он не был с теломерами. Двойное иммунофлуоресентное окрашивание AT к SC35 и TRF2 показало, что на 1-й стадии TRF2 находится в ядерных спеклах, при этом полного совпадения сигналов от TRF2 и SC35 не наблюдается. На 2-й и 3-й стадиях TRF2 находится в ЦТ. Таким образом, локализация TRF2 и ламина A в преовуляторном ооците мыши имеет динамичный характер (Pochukalina, Ilicheva et al., 2016). AT к udTRF2 использовали для выявления TRF2 в ядре ооцита лягушки. AT распознавали TRF2 в ядерной оболочке, что подтверждает предыдущие результаты. На 6-й стадии TRF2 колокализуется с белком SC35 в ядерных спеклах (Ilicheva et al., 2018b).

<u>Нуклеопорины</u>. В КК *R. temporaria* обнаружены структуры, напоминающие поровые комплексы ядерной оболочки (Gruzova, Parfenov, 1977), поэтому мы решили проверить наличие в КК структурных белков поровых комплексов – нуклеопоринов. Для проверки выбрали нуклеопорины Nup93 и Nup53 (Nup35), т. к. это одни из наиболее консервативных структурных белков порового комплекса. Нуклеопорины обнаружены в составе волокнистого компонента КК (Ilicheva et al., 2018b), что согласуется с полученными ранее электронно-микроскопическими данными о локализации в нем псевдопоровых комплексов. Ярко выраженных различий в распределении белков на 5-й и 6-й стадиях не наблюдали. Во всех случаях нуклеопорины выявляются в ядерной оболочке.

<u>Актин.</u> Для выявления актина использовали АТ к трем разным эпитопам его молекулы: к S2-субдомену (Mab1501R), N-концу (A2103) и к C-концу (A2066). В ядре ооцитов мыши АТ MAB1501R и A2103 выявляли актин в нуклеоплазме, а также в ядерных спеклах, идентифицированных с помощью двойного окрашивания с АТ к белку SC35. АТ A2103 также выявляют актин, ассоциированный с ядерной оболочкой, и цитоплазматический актин. АТ к C-концу выявляют актин, ассоциированный с хроматином. Подобные результаты получены при исследовании ранних эмбрионов мыши (Боголюбова, Парфенов, 2012). Во всех трех случаях актин отсутствовал в ЦТ.

В ядре ооцитов лягушки АТ А2066 выявляют актин преимущественно в центральной части КК, причем сигналы от АТ и DAPI частично перекрываются. С помощью АТ А2103 интенсивно окрашивается волокнистый компонент КК, также наблюдается диффузное окрашивание нуклеоплазмы. Моноклональные АТ MAB1501R окрашивают центральную часть волокнистого компонента КК, хромосомы в составе кариосферы и нуклеопазму.

Наличие в ядре ооцита травяной лягушки коротких актин-содержащих филаментов ранее показано методом иммуноэлектронной микроскопии (Parfenov et al., 1995). Для выяснения роли F-актина в КК мы проводили деполимеризацию актиновых филаментов с помощью цитохалазина Д (ЦД). При этом в КК происходят значительные изменения. Ядрышки образуют крупные агломераты, в предельном случае сливаются в одну крупную структуру. В некоторых ядрах конденсированные хромосомы расположены на значительном расстоянии от ядрышек, т. е. кариосфера отделяется от капсулы. Структура самой кариосферы также претерпевает изменения: сохраняя морфологическую целостность, она становится более компактной. Эти изменения особенно заметны на 5-й стадии, когда хромосомы ещё недостаточно конденсированы.



Рис. 5. Выявление фибриллярного актина в ядрах контрольных ооцитов и ооцитов, обработанных ЦД, с помощью TRITCфаллоидина. Масштабная линия 25 мкм.

Для визуализации фибриллярного актина ядра после фиксации обрабатывали TRITC-фаллоидином. В контрольных ядрах F-актин выявляется в волокнистом компоненте КК, причем наиболее интенсивно окрашивалась центральная область капсулы, где расположены хромосомы. После обработки ЦД F-актин в ядре не выявляется, следовательно, при использованных нами условиях обработки актиновые филаменты полностью разрушаются (рис. 5).

Исследовали влияние деполимеризации актиновых филаментов на структуру волокнистого компонента КК. Для визуализации волокнистых структур использовали антитела к нуклеопорину Nup93. В контрольных ядрах Nup93 выявляется в центральной части КК вблизи хромосом. После обработки ЦД Nup93 колокализуется с хромосомами (рис. 6), т. е. в отсутствие актиновых филаментов происходит коллапс волокнистых структур КК.



Рис. 6. Выявление Nup93 в капсуле кариосферы. Nup93 присутствует В центральной части капсулы, вокруг конденсированных хромосом (контроль) и в ядерной оболочке обработки (OR)После ЦД Nup93 колокализуется с Масштабная хромосомами. линия 50 мкм.

Таким образом, актиновые волокна являются структурным каркасом КК и способствуют правильной организации связанных с ней структур – ядрышек, хромосом.

Белки, связанные с компактизацией хроматина. Поскольку формирование кариосферы сопровождается значительными изменениями в структуре хроматина, мы предположили наличие в КК различных белков, отвечающих за ремоделирование хроматина и компактизацию хромосом. В настоящей работе определена локализация хроматин-ремоделирущего белка ATRX и топоизомеразы II (ТороII) в ядрах ооцитов.

Белок ATRX относится к семейству SWI/SNF хроматин-ремоделирующих белков; он связывается с гетерохроматином в центромерных, перицентромерных и теломерных областях хромосом и поддерживает транскрипционно неактивное состояние хроматина. В ооцитах мыши ATRX колокализуется с хроматином в полностью сформированной кариосфере, но не входит в состав ЦТ (De La Fuente et al., 2004). В ооцитах лягушки ATRX обнаружен нами в центральной части волокнистого компонента КК на 5-й и 6-й стадиях развития.

ТороII необходима для правильной конденсации хромосом и их последующего разделения в созревающих ооцитах мыши (Li et al., 2013). По нашим данным, в ооцитах мыши TopoII присутствует в нуклеоплазме и отсутствует в ЦТ, а в ядре ооцитов лягушки обнаружена в центральной части волокнистого компонента КК. Так же как в случае с ATRX, на 5-й стадии наблюдается ассоциация белка с хроматином в некоторых сайтах. На 6-й стадии, когда хроматин находится в максимально конденсированном состоянии, подобной ассоциации не наблюдается.

<u>Малые ядерные РНП.</u> Нами локализованы компоненты мяРНП в ядрах ооцита лягушки на 5-й и 6-й стадиях оогенеза, для чего использованы АТ, распознающие Sm-белки и TMG-кэп мяРНК. Обнаружено, что на 5-й стадии мяРНП находятся в местах остаточной транскрипции, волокнистом компоненте КК и в спеклах различного размера, а на 6-й стадии – только в КК и спеклах, что соответствует затуханию транскрипции к 6-й стадии (разд. 3.3).

3.3 Транскрипция в поздних ооцитах Rana temporaria

Исследовали транскрипционную активность ооцитов в период формирования кариосферы с помощью микроинъекций в ооциты BrUTP. На 5-й стадии, несмотря на достаточно высокую степень компактизации хроматина, наблюдалась остаточная транскрипция хромосомной ДНК, в то время как на 6-й стадии транскрипционная активность хромосом не выявлена. На обеих стадиях можно наблюдать остаточную транскрипцию на ядрышках (рис.7).



Рис. 7. Транскрипция в ядрах ооцитов на 5-й и 6-й стадиях. Масштабная линия 25 мкм.

Для исследования влияния деполимеризации F-актина на транскрипцию проводили микроинъекции BrUTP после обработки ооцитов ЦД (рис. 8). Обнаружено, что разрушение актиновых филаментов не оказывает значительного влияния на транскрипцию. Ядрышки после обработки ЦД сливаются в крупные агломераты, однако транскрипция на этих агломератах продолжается, причем преимущественно на их периферии.



Рис. 8. Идентификация сайтов транскрипции в ядрах ооцитов, обработанных ЦД. Масштабная линия 50 мкм.

3.4 РНК ядра ооцитов *Rana temporaria*

В работе использовали протокол, позволяющий разделить клеточный лизат на цитоплазматическую (Цт), нукеоплазменную (Нп) и хроматин-ассоциированную (X-ac) фракции (рис. 9А, Материалы и методы). В основе метода лежит тот факт, что комплексы ДНК с РНК-полимеразой II и транскрибируемой РНК во время элонгации транскрипции обладают большой стабильностью и не распадаются при воздействии неионных детергентов и 1-2-молярных растворов мочевины (Wuarin, Schibler, 1994). В результате Нп- и X-ас-фракции РНК можно разделить центрифугированием, при этом X-ас РНК будет в осадке вместе с хроматином. В поздних ооцитах *R. temporaria* хромосомы окружены волокнистой капсулой, основу которой, по нашим данным, составляют актиновые филаменты. Разрушения F-актина при воздействии низких концентраций мочевины не происходит (Szent-Györgyi, Joseph, 1951), поэтому РНК, находящаяся в КК, также оказывается в осадке после центрифугирования вместе с X-ас РНК. Для выделения РНК использовали выделенные вручную ядра ооцитов с небольшим количеством цитоплазмы (рис. 9Б).



Рис. 9. Выделение РНК из цитоплазматической (Цт) и нукеоплазменной (Нп) фракций лизата и из капсулы кариосферы (КК). А. Схема метода. Б. Электрофорез РНК из фракций ядерного лизата. Дорожка слева – маркер молекулярного веса.

В Цт-фракции РНК хорошо заметны зоны, соответствующие рРНК. В Нпфракции присутствуют фрагменты размером от 100 до 1500 п.н., в КК – от 500 до 1500 п.н.

РНК из всех трех фракций использовали для приготовления зондов для FISH. Эксперименты по FISH показали, что Цт РНК находится в основном на ядерной оболочке, т. е. фактически в цитоплазме. РНК из Нп- и КК-фракций демонстрируют различную локализацию. РНК Нп-фракции в основном находится на периферии капсулы и лишь небольшая часть – в волокнистом компоненте. КК-фракция выявляется главным образом именно в волокнистом компоненте.

По-видимому, транскрипты, обнаруженные в КК, представляют собой регуляторные РНК, например, длинные некодирующие РНК, необходимые для дальнейшего эмбрионального развития. Мы провели секвенирование препарата тотальной РНК, полученного из целых, выделенных вручную ядер ооцитов лягушки. Схема анализа транскриптома представлена на рис. 10.

Секвенированного генома *R. temporaria* нет в базах данных, поэтому анализ ридов, полученных при секвенировании, представляет определенные трудности. В базах данных есть собранный геном вида того же рода *R. catesbeiana* (Hammond et al., 2017), однако качество сборки невысоко. Мобильные элементы (Transposable Elements, TE) этого и других видов лягушек присутствуют в базе данных повторов Repbase в крайне ограниченном количестве; трудно также ожидать присутствия в Repbase зачастую видоспецифичных тандемных повторов (TII) (Остромышенский и др., 2015). На первом этапе провели сборку очищенных от адаптеров ридов программой Trinity (Trinity1 на рис. 10). Сравнение сборки Trinity1 с Repbase дало возможность идентифицировать TE и рибосомные рДНК, характерные для рода *Rana*. Следующий этап был посвящен приблизительной оценке количества последовательностей разных классов (TE, TII, pPHK) в общем количестве ридов. На первом этапе очистки удалены адаптеры Illumina; затем удалены по 20 п.н. с начала и конца каждого рида.



Рис. 10. Схема анализа транскриптома РНК ядер ооцитов R. temporaria

При анализе k-mer с разными значениями k заметили сильное обогащение ридов простыми последовательностями (A)_k и (CA)_{k/2}. Возможно, их присутствие в транскриптоме ядра ооцита имеет биологический смысл (Komissarov et al., 2018), либо является артефактом секвенирования или пробоподготовки, однако это требует дополнительных исследований. «Простые» последовательности удалили для более эффективной сборки и анализа транскриптома. После удаления простых повторов в оставшихся ридах искали ТП, затем риды снова собрали программой Trinity (Trinity2 на рис. 10).

Программа TAREAN предсказала 5 ТП, из них 3 с высокой вероятностью. Эти ТП обозначены нами как RTC (*Rana temporaria* Capsule) (табл. 2).

Таблица 2. Последовательности ТП, обнаруженные в транскриптоме ядер ооцитов *R. temporaria*

	Название	Содержание	мономер
		в транскриптоме	
1	RTC1	9%	TACAGAGTAACCTAGATTGATCAAACAGTCCTGATAGTC
			CTACAGAGGTTAGATAGTAGGTGTCCAGCATTAGAGGTA
			ACAACTAGAGTACAAACCC
2	RTC2	8%	CAAACGGAACACGAGAATTTTTACCCTACAGAGTAACCT
			AGATTGATCAAACAGTCCTGATAGTCCTACAGAGGTTAG
			ATAGTAGGTGTCCAGCATTAGAGGTAACAACTAGAGTA
3	RTC3	1%	AGAGCCGCTGTTACTAACCTACACTCATACTTGGATCAC
			ACTATGTACTAGGATACATGCAGATAGTACCAAACCCAG
			TGTGCCACTAGTAGCCTATGCTCCTAGTACATAGTGTGA
			TCCAAGTATGAGTGTAGGGTAGTAAC

Консенсусы еще 2-х ТП предсказаны с меньшей достоверностью. Все предсказанные ТП учитывали при определении количества транскриптов каждого класса. В дальнейшем мы планируем доказать присутствие обнаруженных при анализе транскриптома ТП в геноме in vitro и исследовать локализацию соответствующих транскриптов методом FISH в ядрах ооцитов.

Для оценки количества ТЕ и рРНК использовали ТЕ и рРНК, выявленные в Repbase. Их отдельные классы представлены в табл. 3 и 4.

Таблица 3. Семейства ТЕ, найденные в транскриптоме ядер ооцитов *R*. *temporaria*

Название	Количество	Суммарная длина	Процент
		в сборке	
Retroelements	707	131508 bp	8.41 %
SINEs:	251	39280 bp	2.51 %
LINEs:	236	50543 bp	3.23 %
L2/CR1/Rex	10	1015 bp	0.06 %
R2/R4/NeSL	3	108 bp	0.01 %
RTE/Bov-B	4	566 bp	0.04 %
L1/CIN4	217	48781 bp	3.12 %
LTR elements:	220	41685 bp	2.67 %
BEL/Pao	1	220 bp	0.01 %
Ty1/Copia	97	16621 bp	1.06 %
Gypsy/DIRS1	35	6910 bp	0.44 %
Retroviral	85	17657 bp	1.13 %
DNA transposons	90	8170 bp	0.52 %
hobo-Activator	21	1639 bp	0.10 %
Tc1-IS630-Pogo	20	2105 bp	0.13 %
PiggyBac	11	1140 bp	0.07 %
Tourist/Harbinger	3	84 bp	0.01 %
Unclassified	36	3299 bp	0.21%
Unclassified:	89	19257 bp	1.23 %
Total interspersed		158935 bp	10.17 %
repeats			
Small RNA:	926	169791 bp	10.86 %

рРНК (табл. 4) составляет значительную часть транскриптома, что соответствует нашим данным о продолжающейся даже на 6-й стадии транскрипции в ядрышках (рис. 7).

Таблица 4. Разные типы рРНК в очищенном транскриптоме ядра ооцита лягушки по результатам Repeat Explorer

Название	Процент от сборки
45S_pPHK	0.11%
18S_pPHK	2.89%
28S_pPHK	6.03%
рРНК органелл	13.8%

Малые РНК (мяРНК, малые ядрышковые РНК) составляют около 11% транскриптома, около 40% РНК остались неидентифицированными, что неудивительно при отсутствии собранного генома. В той части транскриптома, которая поддается идентификации, около трети из аннотированных ридов относятся к каждому из классов – ТЕ, ТП и рРНК. Среди обнаруженных транскриптов количество ТП превышает количество ТЕ и сравнимо с содержанием рРНК. Общие результаты обработки данных секвенирования сведены в табл. 5:

Таблица 5. Последовательности, обнаруженные в транскриптоме ядра ооцита *R. temporaria*

Типы последовательностей	Содержание в сборке (%)
рРНК	22,72
ТП	18
TE	10,17
Малые РНК	10,68
Не аннотировано	38,43

4 ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Молекулярный состав и функции экстрахромосомных компонентов кариосферы

О молекулярном составе экстрахромосомных компонентов кариосферы до сих пор известно крайне мало, несмотря на многочисленные исследования оогенеза различных организмов. Недостаток знаний послужил основанием настоящей работы. Информация о белковом составе структур, связанных с кариосферой, необходима для выяснения их функций.

Поскольку и ЦТ, и КК тесно ассоциированы с хроматином и необходимы для его поддержания, мы предположили, что в их состав могут входить белки ядерного матрикса. Под понятием «ядерный матрикс» обычно подразумевают белковый который поддерживает хроматин и ядерные каркас, другие структуры. Существование внутреннего ядерного матрикса является спорным, однако ламина, которая считается его частью, безусловно, является скелетной основой ядерной оболочки. Ядерная ламина представляет собой сеть филаментов, состоящих главным образом из белков ламинов. По нашим данным, ламины А- и В-типов входят в состав как КК лягушки, так и ЦТ кариосферы мыши. Ранее ламин В обнаружен также в составе КК ооцитов Tribolium castaneum (Bogolyubov et al., 2013), так что наличие ламинов в составе экстрахромосомных компонентов кариосферы может иметь универсальный характер. Известно, что ламины участвуют в организации хроматина в ядрах соматических клеток. Существуют ламин-ассоциированные домены (lamin-associated domains, LAD) - участки в геноме, связанные с ядерной ламиной. В SN-ооцитах мыши (рис. 3) значительная часть центромерного и перицентромерного гетрохроматина тесно связана с ЦТ (Bonnet-Garnier et al., 2012). Возможно, ламины ЦТ необходимы для связывания гетерохроматина на поздних стадиях развития ооцита. В КК лягушки также обнаружены ламины А- и В-типов, однако динамики в их распределении на 5-й и 6й стадиях не обнаружено. В ооцитах с КК компактизация хроматина в кариосферу обеспечивается, вероятно, не взаимодействием с ламинами, а какими-либо другими механизмами. Оба типа ламинов присутствуют в ядерной оболочке и КК.

Теломер-связывающий белок TRF2 обнаружен ранее в ядерной оболочке ооцитов R. temporaria (Бугаева, Подгорная, 1997; Podgornaya et al., 2000). С помощью AT к комплексам TRF2 с теломерной ДНК этот белок выявлен также в акросоме сперматозоидов мыши (Dolnik et al., 2007). В наших исследованиях что В ядре ооцита мыши TRF2 демонстрирует оказалось. динамичное распределение по мере формирования кариосферы: на 1-й стадии он находится в ядерных спеклах и колокализуется с белком SC35, а на 2-й и 3-й стадиях – в ЦТ (Pochukalina, Ilicheva et al., 2016). Подобная динамика наблюдалась ранее при исследовании белка Y14 - компонента комплекса связи экзонов - у T. castaneum (Kiselev et al., 2017). Этот белок перемещается из ядерных спеклов в КК на поздних этапах оогенеза. Т. е. в обоих случаях ядерные спеклы выступают в качестве транзиторных доменов при перемещении белков в ЦТ или КК. В ооцитах лягушки TRF2 колокализуется с SC35, как и в ооцитах мыши, что удалось выяснить с помощью антител к udTRF2-домену (Ilicheva et al., 2018b).

Ещё одним характерным белком ядерного матрикса является актин. В ядрах ооцитов мыши актин обнаружен в ядерных спеклах, вблизи ядерной оболочки и в ассоциации с хроматином, однако не обнаружен в ЦТ. В составе КК травяной лягушки актин, напротив, представляет собой один из основных компонентов. В значительных количествах F-актин присутствует в ядрах ооцитов некоторых животных, в том числе тех, у которых образуется КК (Bogolyubov et al., 2013; Parfenov et al., 1995), а также участвует в поддержании архитектуры ядра в ооцитах с крупными ядрами (Maslova, Krasikova, 2012). С помощью электронной микроскопии с полевой эмиссией (feSEM) в ядрах ооцитов X. laevis обнаружена сеть актин-содержащих филаментов, прикрепленных к поровым комплексам ядерной оболочки. Эти филаменты пронизывают нуклеоплазму и соединяются с различными ядерными тельцами – ядрышками, тельцами Кахаля, спеклами (Kiseleva et al., 2004). Мы обнаружили, что деполимеризация актиновых филаментов приводит к нарушению структуры кариосферы и КК: кариосфера становится ещё более компактной, нарушается структура волокнистого компонента, ядрышки сливаются в крупные агломераты (рис. 5, 6). Поскольку помимо актина в состав КК входят ламины, можно было предположить, что в отсутствие актиновых филаментов ламины способны поддерживать структуру капсулы, однако оказалось, что именно актиновые филаменты являются структурным каркасом КК.

Формирование кариосферы сопровождается значительными изменениями в структуре хроматина. Очевидно, что эти изменения должны быть связаны с действием различных белков, отвечающих за ремоделирование хроматина и компактизацию Мы определили локализацию хромосом. хроматинремоделирущего белка ATRX и ТороІІ в ядрах ооцитов. В соматических клетках ATRX связывается с гетерохроматином в центромерных, перицентромерных и теломерных областях хромосом и поддерживает транскрипционно неактивное состояние хроматина (Voon, Wong, 2016), а ТороII участвует в процессе конденсации хромосом (Anderson, Roberge, 1992). Оба белка обнаружены в центральной части волокнистого компонента КК лягушки, хотя явной ассоциации с хроматином не наблюдается. В ооцитах мыши ТороII также не связана с хроматином; она распределяется по нуклеоплазме, но не входит в состав ЦТ. В ооцитах птиц TopoII входит в состав белковых тел, ассоциированных с хромосомами на стадии ЛЩ. По мере формирования кариосферы белковые тела сливаются и образуют ЦТ кариосферы, в котором также присутствует ТороII. Ассоциации TopoII с хроматином в случае ооцитов птиц также не наблюдается (Krasikova et al., 2004). Таким образом, в крупных ооцитах птиц и амфибий ТороII находится в экстрахромосомных компонентах кариосферы – в КК или в ЦТ, в то время как в более мелких ооцитах мыши она распределена по нуклеоплазме.

Хроматин-ремоделирующий белок ATRX обнаружен в капсуле кариосферы и некоторых ядерных тельцах жука *T. castaneum*, а также в области, окружающей хроматин у *T. molitor* (Степанова, Боголюбов, 2013). В ооцитах мыши ATRX колокализуется с хроматином в полностью сформированной кариосфере и в хромоцентрах (Baumann et al., 2010). ATRX необходим для правильного формирования веретена деления во время MII: инактивация этого белка с помощью AT и PHK-интерференции не препятствует созреванию ооцитов, но приводит к неправильному выравниванию хромосом во время MII (De La Fuente et al., 2004).

ЦТ кариосферы ооцитов, по-видимому, необходимо для правильной организации хроматина перед оплодотворением. Наличие в его составе белков, взаимодействующих с гетерохроматином, может служить подтверждением того, что хроматин организуется за счет гетерохроматиновых районов. В КК травяной лягушки обнаружены белки ATRX и TopoII, необходимые для правильного протекания последующих мейотических делений, а также факторы сплайсинга. Локализация этих белков может свидетельствовать о том, что КК является не только каркасом, удерживающим хромосомы вместе, но и служит временным хранилищем белков, необходимых для развития ооцита.

4.2 Транскрипция и состав РНК в ядрах ооцитов с капсулой кариосферы

Формирование кариосферы связано со значительным снижением или полным прекращением транскрипции хроматина в ооците. У *R. temporaria* транскрипция в кариосфере наблюдается на 5-й стадии, когда хроматин ещё не достигает максимальной степени компактизации, В то время как В полностью сформированной кариосфере транскрипция отсутствует (рис. 7). У других организмов также наблюдается связь между уровнем транскрипции и степенью компактизации хроматина в кариосфере. У некоторых насекомых остаточная транскрипция сохраняется на ранних этапах формирования кариосферы, когда хромосомы ещё не плотно прилегают друг к другу, а в полностью сформированной транскрипция отсутствует (Bogolyuboy, 2007). кариосфере В ядрышках *R. temporaria* продолжается транскрипция генов рРНК, что хорошо согласуется с данными литературы (Парфенов, Грузова, 1975; Spring et al., 1996).

В настоящее время не существует исследований, в которых были бы идентифицированы транскрипты, образующиеся на стадии кариосферы. Однако есть данные об РНК, транскрибируемой на стадии ЛЩ, предшествующей формированию кариосферы. Есть основания полагать, что транскрипты, синтезированные на этой стадии, присутствуют в ядре и во время формирования кариосферы. Показано, что на стадии ЛЩ активно транскрибируются повторяющиеся последовательности. (Varlei et al., 1980; Gaginskaya et al, 2009 Trofimova, Krasikova, 2016). Например, для многих видов показана транскрипция сателлитных повторов: TkS1 у тритона Triturus cristatus (Baldwin et al., 1985), X1-741 у Xenopus laevis (Jamrich et al., 1983), RrS1 у лягушек Pelophylax ridibundus и *P. lessonae* (Dedukh et al., 2013), PO41 и CNM у курицы (Deryusheva et al., 2007) и теломерных повторов TTAGGG у некоторых других птиц (Solovei et al., 1994). Есть предположение, что транскрипция на ЛЩ начинается с промоторов LTR-элементов, относящихся к TE (Deryusheva et al., 2007). В настоящей работе получены данные о наличии в ядре поздних ооцитов диспергированных и тандемных повторов (рис. 10, табл. 2, 3, 5). Возможно, часть обнаруженных последовательностей синтезирована ещё на стадии ЛЩ.

Высокопроизводительное секвенирование РНК является наиболее эффективным методом исследования транскриптомов клеток, а также отдельных компартментов, таких как ядро и цитоплазма. Ооциты амфибий в этом плане представляют собой удобный объект исследования, поскольку из них можно вручную выделить ядра без контаминации цитоплазмой. Проведено секвенирование ядерной и цитоплазматической РНК, выделенной из ооцитов X. tropicalis на стадии ЛЩ (Gardner et al., 2012). Обнаружено, что в цитоплазме присутствуют транскрипты белок-кодирующих генов, а значительная часть РНК ядра представлена интронами генов, мРНК которых найдена в цитоплазме. РНК интронов в ядрах ооцитов получила название sisRNA (stable intronic sequence RNA), поскольку она обладает высокой стабильностью и присутствует в ядрах после ингибирования сплайсинга в течение по меньшей мере 48 ч. Кроме sisRNA среди ядерной РНК обнаружены малые РНК (мяРНК, мяшРНК, 7SK РНК), а около 30% РНК картировано на неаннотированные последовательности в геноме (Talhouarne, Gall, 2014), которые могут оказаться ТП. В ядрах ооцитов R. temporaria мы также обнаружили малые РНК, которые составляют около 11% всех транскриптов (табл. 3). Поскольку геном *R*. temporaria не секвенирован, значительная часть транскриптов оказалась не аннотированной. Возможно, эти транскрипты могут представлять собой sisRNA.

Обнаруженные ядре В ооцита транскрипты повторяющихся последовательностей, по-видимому, представляют собой компоненты длинных некодирующих PHK (IncRNA, long non-coding RNA). Показано, что многие IncRNA включают транскрипты диспергированных и тандемных повторов (Kapusta et al., 2013; Yang et al., 2015). Такие lncRNA участвуют в организации хроматина, поддержании архитектуры ядра, процессах дифференцировки клеток И эмбриональном развитии (Fadloun et al., 2013; Göke et al., 2015). Разные типы повторов активно транскрибируются во время раннего эмбрионального развития. На двухклеточной стадии в эмбрионах мыши транскрибируется мажорный сателлит, и в это же время перицентромерные районы хромосом организуются в хромоцентры (Probst et al., 2010). На стадии 4 клеток транскрипция резко снижается. Искусственное разрушение транскриптов мажорного сателлита приводит к остановке развития эмбрионов. Эндогенные ретровирусы (ERV), LINE и активно транскрибируются в эмбрионах мыши, SINE также начиная с двухклеточной стадии, а к восьмиклеточной стадии уровень их экспрессии значительно уменьшается (Fadloun et al., 2013). Транскрипция ERV характерна и для эмбрионов человека, причем транскрипция отдельных ERV зависит от стадии развития (Göke et al., 2015). LncRNA эндогенного ретровируса HERVH необходима для поддержания плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток (Lu et al., 2014); дифференциальная транскрипция разных ТЕ участвует и в регуляции дифференцировки клеток (Göke et al., 2015).

Мы предполагаем, что на поздних этапах оогенеза в ядре ооцита накапливются регуляторные транскрипты повторов, необходимые для придания будущей зиготе тотипотентности и для последующего эмбрионального развития.

выводы

1. Центральное тело (ЦТ) кариосферы без капсулы (у мыши) служит дефинитивным компартментом для белка TRF2 наряду с ламином A. TRF2 перемещается в ЦТ из ядерных спеклов. В ЦТ с начала его образования присутствует ламин B, отсутствуют актин и топоизомераза II. В ооцитах лягушки с капсулой кариосферы (КК) TRF2 также присутствует в ядерных спеклах и в ядерной оболочке.

2. В составе волокнистого компонента КК травяной лягушки обнаружены белки ATRX, топоизомераза II, ламины В и А/С, Nup93, Nup35, компоненты мяРНП.

3. F-актин является структурным каркасом ядер с КК, способствует правильной организации хромосом и волокнистого компонента в составе КК, а также многочисленных ядрышек.

4 На 5-й стадии развития ооцита *R. temporaria* выявлена транскрипция хроматина, на 6-й стадии транскрипция хроматина отсутствует. Деполимеризация F-актина не приводит к прекращению транскрипции.

5. В транскриптоме ядер ооцитов *R. temporaria* 5-й стадии развития присутствует значительное количество генов рРНК (~20%), малых РНК (~11%), транскрипты основных классов диспергированных повторов (~10%). Предсказаны 5 тандемных повторов, из них 3 с высокой вероятностью. Впервые показано значительное количество транскриптов тандемных повторов (~18%) в ядре ооцитов амфибий.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи:

1) **Ильичева Н.В.**, Воронин А.П. 2015. Получение рекомбинантного домена теломер- связывающего белка TRF2 и антител к нему. Биотехнология. 1:8–14.

2) **Ilicheva N.V.,** Podgornaya O.I., Voronin A.P. 2015. Telomere repeat factor 2 (TRF2) is responsible for the telomere attachment to the nuclear membrane. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology. 101:67–96.

3) **Ильичева Н.В.**, Кирюшина Д.Ю., Баскаков А.В., Подгорная О.И., Почукалина Г.Н. 2016. Капсула кариосферы ооцитов зимующих лягушек *Rana temporaria* содержит актин, ламины и белки малых ядерных РНП. Цитология. 58(6):451–459.

4) Pochukalina G.N., **Ilicheva N.V.**, Podgornaya O.I., Voronin A.P. 2016. Nucleolus-like body of mouse oocytes contains lamin A and B and TRF2 but not actin and topo II. Molecular Cytogenetics. 9:50.

5) **Ilicheva N.V.,** Travina A.O., Voronin A.P., Podgornaya O.I. 2018a. Development and characterization of polyclonal antibodies against the linker region of the telomere-binding protein TRF2. Electronic Journal of Biotechnology. 32:1–5.

6) **Ilicheva N.**, Podgornaya O., Bogolyubov D., Pochukalina G. 2018b. The karyosphere capsule in *Rana temporaria* oocytes contains structural and DNA-binding proteins. Nucleus. 9(1):516–529.

Тезисы:

1) **Ильичева Н.В.**, Воронин А.П. 2015. Получение антител к рекомбинантному домену теломер-связывающего белка TRF2. БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 19я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 20– 24 апреля 2015 г.). Сборник тезисов : 20.

2) **Ильичева Н.В.**, Подгорная О.И., Почукалина Г.Н. 2016. Ядрышкоподобное тело преовуляторных ооцитов мыши содержит ламин А, ламин В и TRF2. XVII Конференция-школа с международным участием «Актуальные проблемы биологии развития» (Технопарк «Генериум», 10–14 октября 2016 г.). Сборник тезисов : 17–18. 3) **Ilicheva N.V.**, Travina A.O., Voronin A.P., Podgornaya O.I. 2016. The recombinant domain of the telomere-binding protein TRF2 with unknown functions and antibodies to it. BIOMEMBRANES 2016: Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases. International Conference (Dolgoprudny, 26–30 September 2016) Book of abstracts : 101. 4) **Ильичева Н.В.**, Кирюшина Д.Ю., Почукалина Г.Н. 2016. Молекулярные компоненты капсулы кариосферы ооцитов зимующих лягушек *Rana temporaria*. Сборник тезисов V молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии PAH. (Санкт-Петербург, 18–21 сентября 2016) : 21–

22.

5) **Ilicheva, N.V.,** Adonin L.S., Pochukalina G.N., Podgornaya O.I. 2017. Transcriptional activity in oocytes of hibernating frogs *Rana temporaria*. 25th Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus, Nizhny Novgorod, 19–22 June 2017. Programme and abstract book : 86–87.

6) **Ильичева Н.В.,** Кирюшина Д.Ю., Адонин Л.С., Почукалина Г.Н., Подгорная О.И. 2017. Транскрипционная активность в поздних вителлогенных ооцитах травяной лягушки *Rana temporaria*. Цитология. 59(11):763-764.

7) **Ильичева Н.В.,** Кирюшина Д.Ю., Адонин Л.С., Почукалина Г.Н., Подгорная О.И. 2018. Структурные компоненты капсулы кариосферы и остаточная транскрипция в поздних вителлогенных ооцитах *Rana temporaria*. Сборник тезисов V молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН. (Санкт-Петербург, 25–27 апреля 2018) : 41–42.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Боголюбова И.О., Парфенов В.Н. 2012. Цитология. 54(7):541-548. Бугаева Е.А., Подгорная О.И. 1997. Биохимия. 62:1534–1546. Грузова М.Н. и др., 1995. Цитология. 37(8):744-769. Парфенов В.Н., Грузова М.Н. 1975. Цитология. 17(11):1263-1267. Остромышенский Д.И. и др. 2015. Цитология 57(2):102-110. Степанова И.С., Боголюбов Д.С. 2017. Цитология. 59(5):351-361. Anderson H.J., Roberge M. 1992. Cell Biol Int Rep. 16(8):717-724. Baldwin L., Macgregor H.C. 1985. Chromosome Res. 14:777-789. Bilaud T. et al., 1997. Nat Genet. 17, 236–239. Bogolyubov D. 2007. Folia Histochem Cytobiol. 45:129–134. Bogolyubov D. 2018. Int Rev Cell Mol Biol. 337:1-48. Bogolyubov D.S. et al., 2013. Cell Biol Int. 37:1061–1079. Bonnet-Garnier A. et al., 2012. Int J Dev Biol. 56(10-12):877–887. Bouniol-Baly C. et al., 1999. Biol Reprod. 60(3):580-587. Callan H.G. 1986. Mol Biol Biochem Biophys. 36:1–252. Chalopin D. et al., 2015. Genome Biol Evol. 7(2):567–580. Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Anal Biochem. 162(1):156–159. Chouinard L.A. 1971. J Cell Sci. 9:637-663. De La Fuente R. et al., 2004. Dev Biol. 272:1-14. Dechat T. et al., 2008. Genes Dev. 22:832-853. Dedukh D. et al., 2013. BMC Genet. 14:26. Deryusheva S. et al., 2007. Chromosoma; 116:519-530. Dolnik A.V. et al., 2007. Cell Biol Int. 31(4):316-329. Duryee W.R. 1950. Ann NY Acad Sci. 50:920-953. Fadloun A. et al., 2013. Nat Struct Mol Biol. 20(3):332-328. Gaginskaya E. et al., 2009. Cytogenet Genome Res. 124(3-4):251-267. Gardner E.J. et al., 2012. Genes Dev. 26(22):2550-2559. Göke J. et al., 2015. Cell Stem Cell. 16(2):135-141. Gruzova M.N., Parfenov V.N. 1977. J Cell Sci. 28:1-13. Hammond S.A. et al., 2017. Nat Commun. 8(1):1433. Jamrich M. et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA; 80:3364-3367. Kapusta A. et al., 2013. PLoS Genet. 9(4):e1003470. Kiselev A. et al., 2017. Mol Cytogenet. 10:41. Komissarov A.S. et al., 2018. Chromosoma. 127(1):73-83. Krainer A.R. 1988. Nucleic Acids Res. 16(20): 9415-9429. Krasikova A. et al., 2004. Chromosoma. 113:316-323. Laemmli U.K. 1970. Nature. 227:680-685. Lerner E.A. et al., 1981. Proc Natl Acad Sci USA. 78:2737–2741. Li X.M. et al., 2013. Biol Reprod. 89(5):118. Luciano AM, Lodde V. 2013. In: Oogenesis. London: Springer-Verlag. 93–108. Lu X. et al., 2014. Nat Struct Mol Biol. 21(4):423-425. Maslova A., Krasikova A. 2012. Nucleus. 3:300-311. Nair U.B. et al., 2008. J Mol Biol. 384(4):848-864. Novák P. et al., 2017. Nucleic Acids Res. 45(12):e111. Parfenov V.N. et al., 1995. Exp Cell Res. 217:385–394. Podgornaya O.I. et al., 2000. Mol Reprod Dev. 57:16-25. Probst A.V. et al., 2010. Dev Cell. 19(4):625-638. Schliwa M. 1982. J Cell Biol. 92(1):79-91. Solovei I. et al., 1994. Chromosome Res. 2:460-470. Spring H. et al., 1996. Int J Dev Biol. 40(1):263-272. Szent-Györgyi A.G., Joseph R. 1951. Arch Biochem Biophys. 31(1):90-95. Talhouarne G.J., Gall J.G. 2014. RNA. 20(9):1476-1487. Trofimova I., Krasikova A. 2016. RNA Biol. 13(12):1246-1257. Varley J.M. et al., 1980. Nature. 283:686-688. Voronin A.P. et al., 2003. J Anti Aging Med. 6:205-218. Wood A.M. et al., 2014. Nat Commun. 5:5467. Voon H.P., Wong L.H. 2016. Nucleic Acids Res. 44(4):1496–1501. Wu Ñ. et al., 2008. Genetics. 180:61-72. Wuarin J., Schibler U. 1994. Mol Cell Biol. 14(11):7219-7225. Yang F. et al., 2015. Genome Biology. 16:52