

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

УДК: 576.315:591.465.12

КИСЕЛЁВ
Артём Михайлович

Состав ядерных доменов и динамика
слитого белка Y14-Мус в ооцитах
жука *Tribolium castaneum*

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
доктор биологических наук,
профессор
Подгорная Ольга Игоревна
Институт цитологии РАН

доктор биологических наук,
Боголюбов Дмитрий Сергеевич
Институт цитологии РАН

Санкт-Петербург

2015

Оглавление

1	Введение	5
2	Обзор литературы	11
2.1	Объект исследования жук <i>T. castaneum</i>	11
2.1.1	Ядро ооцита <i>T. castaneum</i> как модельная система (оогенез)	16
2.2	Ядерные домены ооцитов	20
2.2.1	Внутриядерные тела в ядрах ооцитов насекомых	20
2.2.2	Кластеры интерхроматиновых гранул	20
2.3	Кариосфера в оогенезе насекомых	25
2.4	Белок Y14 как составная часть комплексов	29
2.4.1	Комплекс связи экзонов (EJC)	29
2.4.2	Деградикация мРНК, содержащих преждевременный стоп-кодон (NMD)	31
2.4.3	Белок Y14	33
3	Материал и методика	36
3.1	Объект	36
3.2	Методы молекулярной биологии	36
3.2.1	Экстракция мРНК	36
3.2.2	Электрофорез ДНК и РНК	37
3.2.3	Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)	37
3.2.4	Клонирование	37
3.2.5	Транскрипция <i>in vitro</i>	38
3.2.6	Методики биоинформатики	38
3.3	Микроинъекции	39
3.4	Флуоресцентная микроскопия	39
3.5	Иммуофлуоресцентное окрашивание	40
3.6	Иммуноэлектронная микроскопия	42
4	Результаты	43
4.1	Динамика ядерных структур ооцитов <i>Tribolium castaneum</i> . Кариосфера и её капсула	43
4.2	Ядерные тельца ооцитов <i>Tribolium castaneum</i>	46
4.3	Транскрипционная активность хромосом, собранных в кариосферу	51
4.4	Компоненты капсулы кариосферы	53
4.5	Конструкция слитого белка Y14-Мус	57
4.6	Транскрипция плазмиды и сплайсинг гена Y14 в клетках человека линии НЕК293	61
4.7	Инъекции мРНК Y14-Мус в ооцит	64
5	Обсуждение	69
5.1	Трудности работы с объектом	69
5.2	Структурные компоненты капсулы кариосферы и активная транскрипция	69
5.3	Динамика ядра ооцита	74
6	Выводы	79
7	Список литературы	80
8	Дополнительные материалы	98

Список сокращений:

BrUTP	bromouridine-triphosphate, бромоуридинтрифосфат
EJC	exon junction complex, комплекс связи экзонов
ESTs	expressed sequence tags, маркёрные экспрессируемые последовательности
FBS	fetal bovine serum, эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота
gap-гены	гены, участвующие в самых ранних этапах развития
kDa	kilodalton, килодальтон
Mb	megabase, мегабаз или млн. н.п. (млн. пар оснований)
NES	nuclear export sequence, последовательность ядерного экспорта
NLS	nuclear localization sequence, последовательность ядерной локализации
NMD	nonsense mediated decay, деградация мРНК, содержащих преждевременный стоп-кодон
ORF	open reading frame, открытая рамка считывания, последовательность нуклеотидов в составе нуклеиновых кислот, потенциально способная кодировать белок
PBS	фосфатно-солевой буфер
Pfu	proofreading polymerase, полимеразы повышенной точности
PML	promyelocytic leukemia bodies, PML-тельца
PTCs	premature terminated codons, нонсенс стоп-кодон
RNAi	RNA interference, РНК-интерференция
RNP	ribonucleoprotein, рибонуклеопротеин
RRM	RNA Recognition Motif, белковый домен, связывающий РНК
SFC	splicing factor compartment, компартмент, содержащий факторы сплайсинга
SR-белки	серин(S)/аргинин(R)-богатые белки
TAE	Tris-acetat-EDTA buffer, Трис-ацетатный буфер
Taq	<i>T. aquaticus</i> thermostable DNA polymerase, термостабильная ДНК полимеразы
TBST	трис-буфер с NaCl и Твин 20
TCR	Т-клеточный рецептор
TFIID	transcriptional factor IID, транскрипционный фактор IID
TFIIF	transcriptional factor IIF, транскрипционный фактор IIF
TMG-кэп, TMГ	trimethylguanosine cap, триметилгуанозиновый кэп
YNS	Y14 Nuclear Signal, ядерный сигнальный домен белка Y14
АТ	антитела
гяРНП, hnRNP	гетерогенные ядерные РНП-частицы, heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
КИГ	кластеры интерхроматиновых гранул
КК	капсула кариосферы
ЛЩ	ламповые щётки
МАЛДИ	матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
мяРНК, snRNA	малые ядерные РНК, small nuclear RNA
мяРНП, snRNP	малые ядерные РНП-частицы, small nuclear ribonucleoproteins
ОТ-ПЦР	ПЦР с обратной транскрипцией
поли(А) ⁺ -РНК	полиаденилированная РНК
пре-мРНК, pre-mRNA	незрелая матричная РНК, premature matrix RNA
пре-рРНК, pre-rRNA	незрелая рибосомная РНК, premature ribosomal RNA
РНК-пол II	РНК-полимераза II

ТГЛ
ТК
ЯТ

тельца гистоновых локусов
тельца Кахала
ядерные тельца

1 Введение.

Актуальность проблемы. Существенный прогресс в развитии методов анализа и расшифровки последовательностей генов, а также механизмов их экспрессии привел к ответам на многие вопросы, касающиеся функционирования клеточного ядра. Остаётся нерешённым ряд задач, связанных с точной локализацией молекулярных компонентов транскрипции, процессинга и экспорта мРНК в трёхмерном пространстве ядра. Активно разрабатывается концепция о роли доменов нуклеоплазмы в регуляции и координации многоступенчатых событий экспрессии генов. Нуждается в уточнении молекулярный состав ядерных доменов, особенно в специализированных клетках. Транскрипция и ранние этапы процессинга мРНК связаны с перихроматиновыми фибриллами (Fakan, van Driel, 2007). Перихроматиновый компартмент, пограничная область между конденсированным хроматином и интерхроматиновым пространством нуклеоплазмы, — место репликации и репарации ДНК (Markaki et al., 2010). Интерхроматиновое пространство ядра содержит около 10 типов различных ядерных доменов, или ядерных телец. Универсальными и эволюционно консервативными среди этих ядерных доменов являются «speckles» (кластеры интерхроматиновых гранул, КИГ, SC35 домены), тельца Кахала (ТК), родственные ТК тельца гистоновых локусов (ТГЛ) и другие (Mao et al., 2011). Считают, что основная функция КИГ состоит в депонировании факторов сплайсинга пре-мРНК (Hall et al., 2006; Spector, Lamond, 2011). Факторы сплайсинга составляют 54 % протеома КИГ (Saitoh et al., 2004), серин/аргинин-богатые белки (SR-белки, в том числе SC35) рассматривают в качестве молекулярных маркеров этих доменов (Spector et al., 1991). В КИГ присутствуют факторы апоптоза, транскрипционные факторы, субъединицы РНК-полимеразы II, факторы полиаденилирования, экспорта мРНК и ряд других (Mintz et al., 1999; Saitoh et al., 2004). В ТК осуществляются поздние этапы процессинга (метилование и псевдоуридинилирование) малых ядерных РНК (мяРНК, или snRNA) при участии ТК-специфических малых

РНК и сборка пресплайсосомных малых ядерных РНП-частиц (мяРНП, или snRNP) (Nizami et al., 2010). ТГЛ содержат факторы процессинга 3'-конца пре-мРНК гистонов, включая U7 мяРНК. Коилин — фосфопротеин, способный образовывать комплексы с мяРНП (Xu et al., 2005), является общим молекулярным маркером ТК и ТГЛ.

Большинство исследований ядерных доменов проведено на постоянных культурах immortalized соматических клеток млекопитающих, значительно отличающихся от нормальных клеток. Меньше известно о белковом и (или) РНК-составе универсальных доменов нуклеоплазмы ооцитов. В ядрах ооцитов домены представлены гетерогенной популяцией телец, разнообразных по морфологии (Bogolyubov, Parfenov, 2008; Bogolyubov et al., 2009).

К характерным чертам организации ядра ооцита многих организмов относится образование кариосферы, или кариосомы, — компактного «клубка» хромосом, формирующегося на стадии диплотены профазы I мейоза. Считают, что образование кариосферы представляет собой один из механизмов инактивации хромосом и подготовки их к редукционному делению (Грузова и др., 1995). Хроматин в составе кариосферы ассоциирован с экстрахромосомным материалом, который у одних объектов формируется снаружи в виде «оболочек» — так называемой капсулы кариосферы (КК), а у других — внутри кариосферы в форме «центрального тела» (Gruzova, Parfenov, 1977; Parfenov et al., 1989).

Объект настоящего исследования — жук-чернотелка, малый булавоусый хрущак *Tribolium castaneum*. В результате секвенирования и публикации собранного и аннотированного генома (Richards et al., 2008) этот вид начинают активно использовать в биологии развития, генетике и клеточной биологии в качестве нового лабораторного объекта. *T. castaneum* имеет несомненные преимущества перед существующими модельными объектами класса Insecta. Это первый среди Coleoptera вид, чей геном полностью секвенирован. Жук лишён ряда специфических, нетипичных для Arthropoda и

(или) вторичных в эволюционном отношении признаков, которыми обладает *Drosophila melanogaster*, но обладает характерными для Coleoptera–Polyphaga особенностями строения женской половой системы и оогенеза (Whiting, 2002; Trauner, Büning, 2007). Наличие полностью собранного и аннотированного генома *T. castaneum* позволяет проводить на ооцитах этого вида не только классические морфологические исследования, но использовать и молекулярно-биологический подход.

До начала наших работ в литературе практически отсутствовало описание морфологических особенностей ядра ооцита *T. castaneum*; в частности, оставались не охарактеризованными кариосфера и экстрахромосомные ядерные домены. В настоящей работе впервые проведено исследование состава ядерных структур ооцитов *T. castaneum* и представлена их базовая характеристика с использованием классических методов иммуоцитохимии на светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях, и современных методик генной инженерии.

Цель и задачи исследования. Основной целью настоящей работы являлась идентификация и характеристика структур ядра ооцитов *T. castaneum*. Для достижения поставленной цели сформулированы следующие задачи:

- 1) Описать морфологию и динамику ядерных структур растущих ооцитов *T. castaneum* на разных стадиях;
- 2) Адаптировать методику для культивирования ооцитов *T. castaneum in vitro*;
- 3) Идентифицировать аналоги эволюционно консервативных ядерных доменов (КИГ и ТК) по присутствию маркерных белков;
- 4) Изучить строение и определить некоторые компоненты капсулы кариосферы (КК);

- 5) Создать и охарактеризовать 5'–экспонированную конструкцию мРНК, содержащую кодирующие последовательности фактора сплайсинга Y14 и Мус-эпитопа в качестве метки (tag);
- 6) Проследить возможную ассоциацию экзогенного слитого белка Y14-Мус с ядерными структурами ооцитов.

Основные положения, выносимые на защиту.

- 1) В ядре ооцитов *Tribolium castaneum* формируется кариосфера, окружённая внешней экстрахромосомной капсулой; присутствуют SC35- и коилинсодержащие экстрахромосомные домены, являющиеся аналогами универсальных ядерных доменов — КИГ и ТК, соответственно.
- 2) Методика временного культивирования соматических клеток *T. castaneum* успешно адаптирована к яичевым трубкам *T. castaneum*: в среде ExCell420 (Sigma) ооциты *T. castaneum* сохраняют транскрипционную активность в течение времени, достаточного для успешной трансляции мРНК конструкции (3 ч).
- 3) Капсула кариосферы *T. castaneum* содержит РНК, в том числе мРНК и поли(А)⁺-РНК.
- 4) Антитела против фактора сплайсинга Y14 выявляют этот белок в составе SC35-содержащих ядерных телец и в капсуле кариосферы ооцитов на поздних стадиях оогенеза.
- 5) Конструкция мРНК Y14-Мус успешно экспрессируется как в клетках человека линии HEK293, так и при инъекции в ооплазму *T. castaneum*.
- 6) В пограничной области между кариосферой и ее капсулой белок Y14-Мус колокализуется со слабо конденсированным хроматином, на котором происходит остаточная транскрипция. Капсула кариосферы является дефинитивным местом локализации белка Y14, а SC35-содержащие тела — транзитным.

Научная новизна работы. Впервые представлена ультраструктурная и иммуноцитохимическая характеристика ядерных доменов ооцитов лабораторного насекомого *T. castaneum* — кариосферы, КК и экстрахромосомных ядерных телец. Обнаружено, что хромосомы развивающегося ооцита *T. castaneum* на стадии диплотены профазы мейоза рано объединяются в компактную кариосферу, которая, в отличие от кариосферы близкого представителя того же семейства *Tenebrio molitor*, имеет развитую КК. Впервые достоверно установлено, что кариосфера, обладающая внешней КК, сохраняет остаточную транскрипцию на поздних стадиях роста ооцита. Впервые показано, что КК содержит не только белки ядерного матрикса, такие как актин и ламин В, но обогащена РНК, включая 5'-триметилгуанозинкэпированные мРНК. Впервые продемонстрировано прямое участие КК в ядерной компартиментализации фактора сплайсинга Y14.

Личный вклад автора. Результаты, включённые в работу, получены лично автором. Материалы, вошедшие в диссертацию, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научными руководителями.

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 11-04-01258) и программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Научно-практическое значение работы. *T. castaneum* является серьёзным вредителем продовольственных запасов, этим жуком заражаются запасы зерновых и их производных, при этом жук проявляет большую степень устойчивости к общим инсектицидам. При анализе генома *T. castaneum* (Maderspacher, 2008) обнаружено, что геном этого вида содержит 265 генов, кодирующих рецепторы вкуса, и 220 генов, кодирующих рецепторы запаха (для сравнения: в геноме медоносной пчелы 170 генов кодируют рецепторы вкуса и 10 генов кодируют рецепторы запаха). Именно эта особенность позволяет жуку проявлять устойчивость к большинству известных инсектицидов.

Изучение особенностей оогенеза жука, а также отработка молекулярно-биологических и биоинформатических подходов в работе с этим объектом позволят создать новые типы биологического воздействия, пригодные для уничтожения этого вредителя.

Работа носит фундаментальную направленность и расширяет представления о структурно-функциональной компартментализации ядра ооцита, молекулярном составе и динамике его универсальных (ТК, КИГ) и специфических (кариосфера с экстрахромосомной КК) ядерных доменов. Продемонстрирована плодотворность использования модельной системы «ядро ооцитов при полигеномном типе оогенеза» для изучения проблемы функциональной морфологии клеточного ядра и трансформации ядерных структур. Результаты данной работы могут быть полезны в качестве базовой основы для специалистов различного профиля, работающих с ооцитами модельных биологических объектов. Кроме того, результаты работы могут быть использованы в курсах лекций по частным разделам биологии развития и клеточной биологии при подготовке специалистов соответствующих кафедр высших учебных заведений биологического профиля и включены в руководства и учебные пособия.

Материалы работы используются при проведении генно-инженерной практики по курсу «Методы молекулярной биологии» на Кафедре цитологии и гистологии СПбГУ.

2 Обзор литературы

2.1 Объект исследования жук *T. castaneum*

Отряд Coleoptera является удивительным примером успешной эволюции. Эволюция этого отряда началась 285 млн. лет назад (Ной, 2013) и привела к большому разнообразию представителей (Trauner et al., 2009).

Основным эволюционным приобретением, которое позволило этому отряду получить эволюционное преимущество, являются характерные для жуков твердые надкрылья, прикрывающие задние, летательные крылья. Жесткие и твердые надкрылья позволили жукам занимать экологические ниши наземных, ползающих насекомых, но в то же время оставить за собой чрезвычайно выгодную и полезную способность к полету. Например, муравьи сохранили способность взлетать только у определенных каст и только в определенное время, а жесткие надкрылья позволили жукам летать в любое время при необходимости (Trauner et al., 2009).

Основная часть данных о генетических механизмах, характерных для членистоногих, получена из исследований, проведенных на хорошо изученном и широко известном лабораторном объекте — мухе *Drosophila melanogaster* (Peel, 2009).

Несмотря на многочисленные достоинства этого модельного объекта, возможности применения полученных на нём данных для других видов ограничены. Например, такие удобные для исследований особенности этого вида, как небольшой размер генома и короткий цикл размножения, нетипичны для большинства артропод. Долгое время считалось, что для понимания особенностей анцестрального предка и эволюции развития артропод требуется глубокое изучение большого количества видов. Для решения большинства теоретических и практических вопросов необходимо изучать виды, которые морфологически, физиологически и экологически отличаются от дрозофилы. Необходимо сосредоточиться на менее специализированных видах артропод с большим, чем у дрозофилы, геномом.

Для таких видов необходимо разработать надежные и эффективные методы генетического манипулирования. В последние годы в этой области произошел большой прогресс.

Несмотря на высокую эволюционную успешность Coleoptera и их близость к общему анцестральному предку животных, до недавнего времени не было опубликовано ни одного генома представителей этого отряда.

Для полногеномного секвенирования был выбран жук *T. castaneum*, имеющий большое хозяйственное значение как сельскохозяйственный вредитель. *T. castaneum* хорошо описан с точки зрения классической генетики и недавно стал модельной системой для сравнительной биологии развития.

Жук *T. castaneum* является членом семейства Tenebrionidae, историческое тривиальное название небольших жуков этого семейства — мучной жук. *T. castaneum* является серьёзным вредителем сельскохозяйственных запасов зерновых продуктов. Цикл развития жука до полового созревания составляет 3—8 недель в зависимости от температуры, размножаться он может в течение длительного времени. Все эти особенности делают *T. castaneum* идеальным лабораторным объектом. Вид является космополитом, место его происхождения не установлено. Неизвестно, чем питался *T. castaneum* до изобретения муки около 10 тысяч лет назад. На основании морфологии, а также экологии питания есть причины считать, что предки *T. castaneum* жили под корой гниющих деревьев и питались продуктами разложения растительного происхождения (Pultz et al., 2000).

Размер генома жука около 160 Mb (у дрозофилы 140 Mb). Число генов у *T. castaneum*, предположительно кодирующих белки, около 16 тыс., что больше, чем у *Drosophila*. Поскольку оценка проводилась биоинформатическими методами, разработанными для дрозофилы, неизвестно, отражает ли она действительно общее количество ORF у жука, или свидетельствует о несовершенстве методов биоинформатики. (Richards et al., 2008; Sulston, Anderson, 1996).

Среди других насекомых с известными геномами, таких как дрозофила или малярийный комар (Jiang et al., 2014), *T. castaneum* выглядит как «менее специализированный» (less derived) вид. Известно, что эволюционная ветвь, ведущая к дрозофиле, эволюционировала гораздо быстрее остальных насекомых (Tomoyasu et al., 2008). Сравнительный анализ геномов показал, что жук *T. castaneum* является «более типичным», или менее специализированным, представителем Insecta, чем дрозофила.

Морфология развития дрозофилы и жука *T. castaneum* различаются. У дрозофилы ранний эмбрион заполняет собой всё пространство яйца, и сегменты относительно синхронно формируются из общего зачатка. Эмбриональные клетки находятся в непосредственном контакте друг с другом через тяжи цитоплазмы и формируют синцитий. Синцитий позволяет факторам (белкам, транскрипционным факторам и т.д.), которые управляют развитием, распространяться диффузно. В результате оси тела у мухи формируются сразу для всего эмбриона с последующей регионализацией и сегментацией. Это приспособление позволяет эмбриону дрозофилы развиваться с высокой скоростью, но только в определённых благоприятных условиях, а именно в фруктовом пюре.

Развитие жука идёт значительно дольше, чем у дрозофилы, но при этом он может развиваться в неблагоприятных условиях. В отличие от дрозофилы, в процессе сегментации у *T. castaneum* и большинства других насекомых одновременно формируются только два сегмента, голова и грудь (торакс), при этом в задней части груди образуется зона роста. Остальные сегменты появляются последовательно из этой зоны роста. Клетки эмбриона *T. castaneum* не формируют синцитий, и диффузное распространение транскрипционных факторов невозможно (Horn et al., 2002). Поскольку эмбриональное развитие этих двух видов детерминируется в большинстве своём одними и теми же эволюционно консервативными факторами, возникает очевидный вопрос: в чём различия механизмов формирования общего плана эмбриона между настолько разными типами эмбриогенеза жука

и дрозофилы, и отражены ли морфологические различия эмбриогенезов в молекулярных механизмах?

Этот вопрос решают с помощью создания коллекции мутантов. Такой подход был впервые предложен более 30 лет назад в работе Нюсслеин-Волхард (Nüsslein-Volhard, Wieschaus, 1980). Мутантные фенотипы удалось классифицировать по группам и выявить гены — источники мутаций. Классификация привела к открытию генов материнского эффекта, гар-генов, и положила начало новому разделу биологии — эволюционной биологии развития.

Тот же классический подход, называемый сейчас методом ненаправленного мутагенеза, использовала группа под руководством Траунера для того, чтобы понять, существуют ли принципиальные различия между молекулярными механизмами раннего эмбриогенеза мухи и жука *T. castaneum* (Trauner et al., 2009). В случае, если развитие жука управляется иными генетическими взаимодействиями, чем у дрозофилы, группы мутантов и их особенности будут отличаться от групп, описанных в работах Нюсслеин-Волхард. Скрининг специфических классов мутантных фенотипов, полученных при помощи химического воздействия или гамма-облучения, был проведен ранее и на паразитической осе *Nasonia viteripennis* (Pultz et al., 2000). Личинки *T. castaneum* имеют развитые конечности и голову с ротовыми придатками, в то время как личинка дрозофилы не имеет развитых конечностей, а сегменты ее головы инвагинированы (Horn et al., 2002). Изучение коллекции мутаций, связанных с развитием *T. castaneum*, дало возможность понять логику работы систем и генов, отвечающих за развитие жука, без оглядки на гены дрозофилы. Стала понятна регуляция развития структур, которые либо отсутствуют, либо слабо развиты у личинок мух, например передней части личинки жука и её конечностей (Trauner et al., 2009).

Наличие собранного и аннотированного генома в значительной степени облегчает понимание функционирования генных каскадов,

детерминирующих раннее развитие. Большинство генов, задействованных в эмбриональном развитии дрозофилы, присутствует в консервативном виде и в геноме *T. castaneum*. Гены раннего развития всех насекомых, и жука в частности, используют в основном те же сигнальные пути, что и большинство животных (Sulston, Anderson, 1996). Но есть и отличия. Например, у *T. castaneum* нет ортолога гена *Bicoid*. Вместо *Bicoid* функцию образования градиента передней части зародыша берет на себя гомодоменный транскрипционный фактор *Otd*. *Otd* формирует anteriорный градиент и, взаимодействуя с *Hunchback*, детерминирует развитие головы и торакса жука. Среди набора мутантов интересны мутанты жука с выключением большей части генов *Hox*-кластера (Galindo et al., 2007). Такая мутация возможна только потому, что *T. castaneum*, в отличие от мухи, сохранил *Hox*-кластер в неразделённом виде. При мутации *Hox-less* мутантная личинка демонстрирует поразительный фенотип: изменяются передне-задние оси всех сегментов таким образом, что сегменты либо теряют конечности, либо вместо конечностей несут антенны.

Мутационный анализ показал, что, несмотря на различающиеся морфологию и физиологию развития жука, мухи и других животных, логика работы генома в раннем развитии консервативна и в значительной мере применима к большинству животных. Так же как и у дрозофилы, у *T. castaneum* происходит деление эмбриона на всё меньшие и меньшие области (Pavlopoulos et al., 2004; Lorenzen et al., 2007).

Жук *T. castaneum* является единственным представителем отряда Coleoptera с известным, секвенированным и собранным геномом. “Типичность” этого вида даёт возможность применять полученные на нём данные не только для артропод, но и для представителей других типов. В настоящей работе мы использовали это преимущество.

2.1.1 Ядро ооцита *T. castaneum* как модельная система (оогенез)

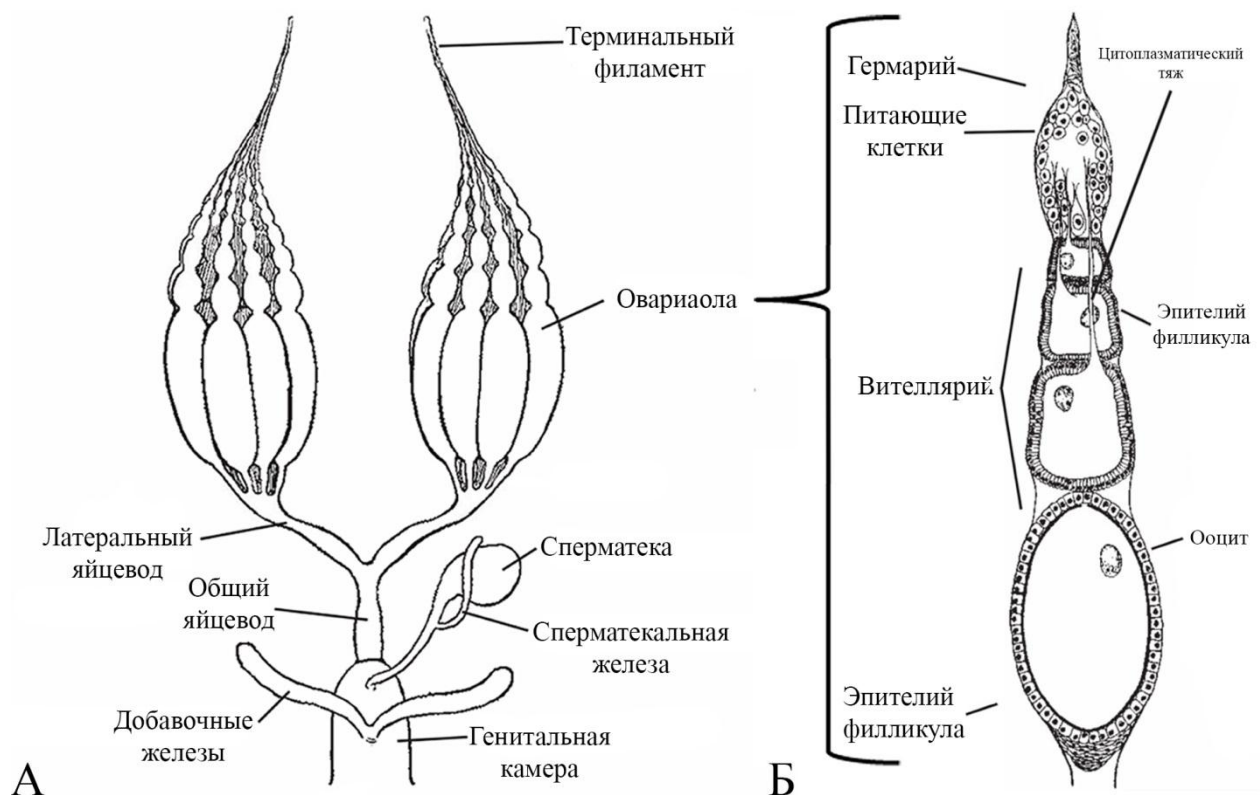


Рис. 1 Женская половая система насекомых (Klowden, 2007). **А** — общий вид женской половой системы насекомых (по Snodgrass, 1935). **Б** — отдельная овариола мероистического телотрофного типа (по Schwalm, 1988).

Женская репродуктивная система насекомых состоит из пары яичников, которые при помощи латеральных яйцеводов соединяются с общим яйцеводом (Рис. 1). Яичники состоят из овариол — яйцевых трубочек, в которых проходят все процессы оогенеза.

Яйцевая трубка покрыта слоем мышц, эпителием и соединительнотканной оболочкой. В верхней части овариолы располагается терминальный филамент. Филаменты овариол двух яичников соединяются друг с другом и закрепляются в дорзальной диафрагме насекомого.

Выделяют овариолы мероистического и паноистического типов. Важно отметить, что паноистическому типу овариол соответствует оогенез фолликулярного типа (Равен, 1964), в котором развитие ооцита идёт по аутоотрофному пути (Гагинская, 1975). Поли- и телотрофным мероистическим

овариолам соответствует оогенез нутриментарного типа (Равен, 1964) и гетеротрофный путь развития ооцита (Гагинская, 1975).

В овариолах мероистического типа ооциты и трофоциты напрямую связаны посредством цитоплазматических тяжей (фузомы). Эта связь ооцита с питающими клетками в пределах овариолы может быть организована разными способами. В зависимости от способа связи ооцита и питающих клеток овариолы мероистического типа делят на политрофные и телотрофные. В овариолах политрофного типа ооциты и трофоциты, связанные между собой цитоплазматическими тяжами, формируют камеры, распределенные по всей длине овариолы. В овариолах телотрофного типа трофоциты располагаются только в гермarii и также связаны с ооцитами цитоплазматическими тяжами.

Овариола телотрофного типа состоит из гермarii и вителлarii, которые содержат фолликулы различных стадий развития (Рис. 1) Гермарий содержит первичные оогонии и фолликулярные клетки, а вителларий — ооциты на различных стадиях развития. Оогенез начинается в гермarii, так же в нём формируются вторичные оогонии.

В овариолах мероистического типа процессы деления первичных оогониев завершаются еще до появления у насекомого крыльев. Первичные оогонии митотически делятся с образованием вторичных оогониев. Цистоциты, связанные цитоплазматическими тяжами, или фузомами, формируются из синхронно делящихся вторичных оогониев. У цистоцитов различных поколений обнаруживается различное число фузом, количество фузом зависит от числа делений и определяет дальнейшую судьбу клетки. В дальнейшем цистоциты либо становятся трофоцитами, либо сливаются в трофический синцитиальный гермарий, либо становятся сопровождающими клетками ооцита в фолликулах вителлarii.

Начальная фаза развития ооцита называется периодом размножения и состоит в том, что оогонии делятся с образованием ооцитов первого и второго порядка. Вступившие в мейоз клетки называют ооцитами I порядка.

Собственно мейоз подразделяют на период роста, охватывающий профазу и период созревания (ооциты II порядка). Период роста подразделяют на фазу малого роста (стадии лептотены, зиготены, пахитены профазы) и стадию большого роста, охватывающую относительно продолжительную по времени стадию диплотены. В свою очередь, период большого роста подразделяют на фазу цитоплазматического роста (превителлогенез) и стадию трофоплазматического роста (вителлогенез). На этапе вителлогенеза основной задачей является накопление желтка. Трофоциты транспортируют по фузомам не только простые соединения, нуклеиновые кислоты, белки, но также собранные рибосомы и митохондрии. При этом сборка и распределение переданных запасных веществ контролируется ядром ооцита.

Трофоциты в значительной степени облегчают развитие яйцеклетки, благодаря такому механизму оогенеза самка может мобилизовать все накопленные резервы и за короткий период отложить значительное количество яиц. Повышенное по сравнению с другими членистоногими количество желтка является приспособлением к условиям наземного существования. В яичниках членистоногих других групп нет вителлярия, а их яйца содержат значительно меньше желтка.

Этапы вителлогенеза обычно идут только в последних фолликулах вителлярия, при этом источником вителогенных веществ выступает жировое тело. На регуляцию процессов вителлогенеза у насекомых существенно влияют количество и качество корма, плотность особей, сосредоточенных в определённом объёме. Кроме того, важными факторами являются температура и влажность. На последних этапах вителлогенеза яйцо покрывается желточной оболочкой и хорионом. Ооогенез заканчивается после появления полярных (редукционных) тел и формирования гаплоидного женского пронуклеуса. После этого яйцо прорывает тонкую эпителиальную зону у основания овариолы и спускается в латеральный яйцевод. После прохождения общего яйцевода яйцо проходит мимо протока семяприёмника и оплодотворяется. Во время оплодотворения сперматозоиды проходят через

микропилярные отверстия хориона, образованные остатками плазматических нитей, которые связывали ооцит с фолликулярными клетками. После оплодотворения яйцо приступает к мейозу. Откладка яйца обычно происходит в метафазе первого мейотического деления.

Объект настоящего исследования жук *T. castaneum* имеет типичные мероистические яичники телотрофного типа, которые легко разделить на отдельные овариолы. Кроме того, выделенные овариолы можно культивировать *in vitro* в подходящих средах.

2.2 Ядерные домены ооцитов

2.2.1 Внутриядерные тела в ядрах ооцитов насекомых

Ядро ооцита насекомых имеет весьма сложную структуру. Большое количество электронно-микроскопических работ 1960—80 годов привели к накоплению большого количества данных о присутствии в ядрах ооцитов насекомых морфлогически разнообразных экстрахромосомных ядерных структур (Gruzova, 1988; Gruzova, Parfenov, 1993; Грузова, 1977). Эти структуры объединяют под общим названием “внутриядерные тельца”.

Ядро ооцита очень упорядочено и состоит из трёх чётких морфологических компартментов: хроматин, ядрышки и интрехроматиновое пространство (Raška et al., 1992). Интерхроматиновое пространство содержит около 10 типов экстрахромосомных ядерных доменов (компартментов, или ядерных телец (ЯТ), которые содержат большой спектр молекулярных факторов, отвечающих за различные аспекты экспрессии генов. Среди этих ядерных доменов наряду с ядрышками и тельцами Кахала универсальными и эволюционно консервативными структурами являются ядерные «speckles», в терминах электронной микроскопии представляющие собой кластеры интерхроматиновых гранул (КИГ) (Spector, Lamond, 2011).

2.2.2 Кластеры интерхроматиновых гранул

Термин «кластер интерхроматиновых гранул» относится к электронной микроскопии, в терминологии флуоресцентной микроскопии этот компартмент называют “speckles”, также встречается название компартмент, содержащий факторы сплайсинга (splicing factor compartments, SFCs) или SC35-содержащие домены (SC35).

Типичная интерхроматиновая гранула имеет размер 20—25 нм (Swift, 1963). Эти гранулы обычно собраны в кластеры. Внутри кластеров интерхроматиновые гранулы связаны между собой фибриллярным материалом (Monneron, Bernhard, 1969; Puvion, Moyne, 1981).

Первое детальное описание ядерных доменов, которые теперь называются КИГ, было представлено Рамоном Кахалом в 1910 (Cajal, 1910; цит. по Lafarga et al., 1989). С помощью окраски анилиновым кислым Кахал обнаружил структуры, которые он описал как “полупрозрачные сгустки”. Термин «speckles» был впервые выдвинут в 1961 году Джоном Бекем (Beck, 1961), хотя на самом деле эти же структуры были обнаружены двумя годами ранее Хьюсоном Свифтом (Swift, 1959) при помощи электронного микроскопа и были названы «интерхроматиновые частицы». Кроме того, Свифт показал, что КИГ содержат РНК (Swift, 1959).

Однако связь между сплайсингом пре-мРНК и КИГ была показана только после исследования распределения мяРНК с использованием антител против факторов сплайсинга, которые продемонстрировали «пятнистый» (speckled) характер распределения мяРНК в ядре клетки (Lerner et al., 1981; Spector, 1993).

Сейчас известно, что большинство факторов сплайсинга, которые наблюдаются с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии, присутствуют в КИГ.

Гранулы в КИГ беспозвоночных обычно крупнее (до 70 нм против 20—25 нм), а сами КИГ из-за присутствия в них фибриллярного материала, вероятно, более сложно устроены, чем у позвоночных, (Batalova et al., 2005; Bogolyubov, Parfenov, 2001; Bogolyubov, Stepanova, 2007; Handwerger, Gall, 2006, 2006; Боголюбов, 2003).

Состав и функции КИГ в настоящее время интенсивно изучаются (Dundr, Misteli, 2001; Hall et al., 2006; Handwerger, Gall, 2006; Lamond, Spector, 2003; Misteli, Spector, 1998). КИГ обогащены факторами сплайсинга пре-мРНК, мяРНК и SR-белками (Dundr, Misteli, 2001; Lamond, Spector, 2003; Wu et al., 1991).

Классическим маркером КИГ является SR-белок SC35 (Fu, Maniatis, 1990; Spector et al., 1991). КИГ динамичны, они очень чувствительны к изменениям транскрипционного статуса клетки и различным сигналам,

которые оказывают влияние на факторы транскрипции и процессинга РНК (Misteli et al., 1997; Spector, 1993). Размеры и форма КИГ являются отражением динамики накапливающихся в них и покидающих их белков. Показано, что каждую секунду КИГ покидают около 12000 молекул фактора сплайсинга SF2/ASF (Misteli, 2001).

С помощью светооптической и электронной микроскопии показано, что КИГ не содержат ДНК (Thiry, 1992). Тем не менее, КИГ часто наблюдают недалеко от зоны активной транскрипции. Видимо, КИГ связаны с механизмами экспрессии генов (Brown et al., 2008; Huang, Spector, 1991; Johnson et al., 2000).

Вблизи периферических зон КИГ с большей вероятностью локализуются участки хромосом с генами высокой копийности (Shopland et al., 2003). Возможно, КИГ действуют как функциональные центры, которые организуют эухроматиновые локусы активных генов (Spector, Lamond, 2011). Возможно, КИГ являются компартментами запасаения, сборки и модификации факторов сплайсинга в местах активной транскрипции (Shopland et al., 2003). Эксперименты по импульсному мечению с использованием BrUTP показали, что недавно синтезированная пре-мРНК преимущественно локализована вне КИГ — в перихроматиновых фибриллах (Smarko et al., 1999).

Вероятно сплайсинг, происходящий во время транскрипции, ассоциирован с перихроматиновыми фибриллами, а не с КИГ.

Перихроматиновые фибриллы могут существовать как на периферии КИГ, так и вне их (Fakan, 1994). Могут возникать проблемы с идентификацией и дифференциацией этих структур из-за того, что нет определенных белковых маркеров для каждой из них. Гены с высоким уровнем экспрессии могут привлекать значительное количество факторов сплайсинга пре-мРНК (Huang, Spector, 1991), поэтому участок активной транскрипции может быть неотличим от КИГ на световом уровне. Многие специалисты не рассматривают КИГ как главные центры сплайсинга и

транскрипции пре-мРНК. Но есть мнение, что роль КИГ в сплайсинге и транспорте пре-мРНК существенна (Hall et al., 2006).

В КИГ было обнаружено большое количество факторов сплайсинга пре-мРНК, включая мяРПП и SR белки (Fu, 1995), несколько киназ (Clk/STY, hPRP4, PSKH1) (Brede et al., 2002) и фосфатаз (Trinkle-Mulcahy et al., 2001), которые фосфорилируют или дефосфорилируют компоненты сплайсосомы. Это подтверждает идею о том, что КИГ могут быть включены в регуляцию состава комплекса факторов, которые необходимы для транскрипции и (или) процессинга пре-мРНК (Misteli et al., 1997).

Белковый состав ядерных КИГ был изучен при помощи протеомного анализа обогащенных КИГ фракций, выделенных из ядер гепатоцитов печени крысы. Метод МАЛДИ позволил идентифицировать 146 известных белков и предсказать наличие ORF большого количества неизвестных белков (Saitoh et al., 2004).

81 % белков, идентифицированных в КИГ, связан с метаболизмом РНК. 54 % белков КИГ имеет отношение к сплайсингу пре-мРНК. Также КИГ содержат довольно большой процент белков, вовлечённых в иные ядерные функции (Saitoh et al., 2004). В частности, в КИГ обнаружены транскрипционные факторы (Jordan et al., 1997), факторы процессинга 3'-конца РНК (Schul et al., 1996), факторы созревания 3'-конца РНК (Schul et al., 1999), факторы экспорта мРНК (Saitoh et al., 2004; Schmidt et al., 2006), фактор инициации трансляции eIF4E (Dostie et al., 2000), а также ряд структурных белков, например, ламин А и актин (Lamond, Spector, 2003). КИГ не содержат факторов, участвующих в биогенезе субъединиц рибосомы или тРНК.

В составе КИГ обнаружены поли(А)⁺-РНК (Huang et al., 1994). В исследованиях, проведённых на ядрах соматических клеток млекопитающих, было установлено, что популяция поли(А)⁺-РНК в КИГ мобильна, при этом постоянно осуществляется обмен молекулами поли(А)⁺-РНК между КИГ и окружающей нуклеоплазмой (Ishihama et al., 2008). Динамичная ассоциация

поли(A)⁺-РНК и КИГ в транскрипционно инактивированных клетках сохраняется (Spector, Lamond, 2011). Наличие РНК в КИГ объясняется несколькими гипотезами: (1) с КИГ может быть связана утилизация ненужных молекул поли(A)⁺-РНК (Puvion, Puvion-Dutilleul, 1996); (2) часть поли(A)⁺-РНК в КИГ представляет собой большие некодирующие (large noncoding) полиаденилированные РНК, контролирующие экспрессию генов и метаболизм мРНК (Morey, Avner, 2004); (3) часть поли(A)⁺-РНК КИГ является мРНК или пре-мРНК (Hall et al., 2006).

КИГ — динамичные структуры, и их содержимое может непрерывно перемещаться между КИГ, нуклеоплазмой и другими ядерными структурами, включая активные транскрипционные сайты. Исследования состава, структуры и динамики КИГ предоставили важную информацию для понимания функциональной организации ядра и механики генной экспрессии.

2.3 Кариосфера в оогенезе насекомых

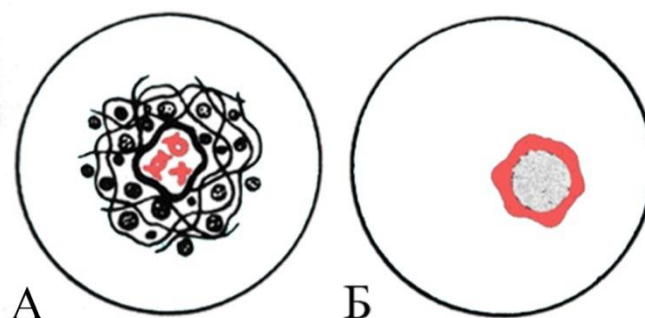


Рис. 2 Типы строения кариосферы. **А** — кариосфера с внешней капсулой. **Б** — кариосфера с «инвертированной» капсулой. Красным обозначен хроматин.

Кариосфера впервые была описана Блэкменом в ядрах сперматоцитов многоножек (Blackman, 1903; цит. по Грузова и др., 1995), хотя её формирование характерно в большей степени для оогенеза (Gruzova, Parfenov, 1993).

В современной литературе кариосферу считают результатом концентрации всех конденсированных хромосом ооцита в ограниченном объёме ядра. Это приводит к образованию единой сложной структуры, в которую зачастую включается материал ядрышка и (или) разнообразных ЯТ. В некоторых случаях собранные в кариосферу хромосомы изолируются от окружающей нуклеоплазмы при помощи особого образования — капсулы кариосферы (КК) (Грузова и др., 1995).

Время формирования кариосферы, как правило, видоспецифично и может быть приурочено к началу, середине или концу диплотены мейоза (Грузова, 1977). У насекомых с гетеротрофным типом оогенеза кариосфера выглядит наиболее типично, она появляется в начале диплотены мейоза и существует вплоть до конца периода роста ооцита.

Характер формирования кариосферы в ооцитах различных насекомых во многом похож, в это время происходит конденсация хроматина и части экстрахромосомного материала ядра. Вместе с тем формирование кариосферы носит и видоспецифичные черты, заключающиеся в наличии или

отсутствии капсулы кариосферы (Рис. 2), а также в степени конденсации хроматина.

В оогенезе *Drosophila melanogaster* образование кариосферы происходит после стадии пахитены профазы мейоза (Cummings, King, 1969). Кариосфера *D. melanogaster* представляет собой плотную хроматиновую массу около 2 мкм в диаметре. Она находится в контакте с тельцем Кахала (Liu et al., 2006). При этом у мухи не формируется капсула кариосферы. Для комаров характерно образование сложной капсулы кариосферы, в формировании которой принимают участие различные внутриядерные структуры, в числе которых дериваты синаптонемных комплексов (Fiil A., Moens P.B. 1973; Fiil, 1974).

У сетчатокрылых насекомых (отр. Neuroptera) также образуется кариосфера. При этом в ооците ранних стадий развития объединяются транскрипционно неактивные хромосомы. Вокруг кариосферы формируется сложная капсула (Грузова, Зайчикова, 1968, 1972), основным молекулярным компонентом которой является фибриллярный актин (Rübsam, Büning, 2001).

У некоторых насекомых морфологическая организация кариосферы может заметно различаться даже в пределах одного семейства. Так, у многих видов жуков-чернотелок образуется кариосфера с развитой, сложной капсулой и экстрахромосомными структурами в её составе (Александрова, 1992; Грузова, 1960; Грузова, Баталова, 1979). В то же время у представителя того же семейства мучного хрущака *T. molitor* капсула кариосферы отсутствует, а степень конденсации хроматина весьма высока (Bogolyubov, Parfenov, 2001). Видоспецифичные особенности организации кариосферы могут быть связаны с особенностями биологии размножения конкретных видов насекомых (Боголюбов и др., 1997).

В настоящее время кариосфера описана у представителей более чем 120 видов животных (Gruzova, Parfenov, 1993).

Кариосфера формируется на фоне снижения транскрипционной активности хромосом, и поэтому формирование кариосферы может служить

морфологическим отражением инактивации хромосом. Однако среди насекомых можно найти всю гамму переходов от полного отсутствия включения H^3 -уридина в кариосферу (*Chrysopa perla*) (Грузова, 1960), до весьма значительного включения метки в неё (*Calliphora erythrocephala* и *Musca domestica*). В кариосфере *Tenebrio molitor*, для которой характерна очень высокая степень компактизации хроматина (Bogolyubov et al., 2000), транскрипция выключается к концу роста ооцита (Bogolyubov, 2007). К сожалению, вопрос о типах РНК, которые синтезируются во время формирования кариосферы, до сих пор остаётся не выясненным.

Молекулярные механизмы формирования кариосферы также остаются неизвестными. Анализ мутантов *Drosophila* по гену *nhk-1* (nucleosomal histone kinase-1), у которых хромосомы ооцитов не способны формировать кариосферу, позволили предположить, что в процессе её формирования существенную роль играет специфическое фосфорилирование гистона H2A по треонину в 119-м положении (Ivanovska et al., 2005). Авторы предложили, что после завершения рекомбинации и дефосфорилирования гистонов H2A по серину в 139-м положении, происходит фосфорилирование гистонов H2A по треонину в 119-м положении киназой NHK-1, после чего происходит разборка синаптонемного комплекса и привлечение конденсинов на хромосомы, что и завершается формированием кариосферы (Ivanovska et al., 2005).

Формирование кариосферы — весьма динамичный процесс, сопровождающийся появлением в её составе экстрахромосомного материала и многочисленных внутриядерных телец (ЯТ) различного строения и состава (Świątek, Jaglarz, 2004; Баталова и др., 2000). У насекомых с мероистическими яичниками ЯТ ооцитов наиболее многочисленны и морфологически разнообразны именно в период формирования кариосферы (Gruzova, 1988).

Морфологически капсулы кариосферы (КК) оказались сходными у разных насекомых. Волокнистый материал капсулы представляет собой

сочетание элементов синаптонемного комплекса, автономных поровых комплексов (annuli, колечки), однако комбинироваться эти структуры могут по-разному (см. обзор (Gruzova, Parfenov, 1993). В составе КК некоторых жуков-долгоносиков (Świątek, 1999) и сетчатокрылых насекомых (Rübsam, Büning, 2001) был обнаружен фибриллярный актин. В контакте с капсулой и внутри неё могут находиться различные ЯТ, как у *T. nomas taurica* (Александрова, 1992).

Функциями капсулы кариосферы, по-видимому, являются, во-первых, механическое удержание хромосом в ограниченном участке крупного ядра, во-вторых, защита от возможных повреждений инактивированных хромосом в метаболически активном ядре ооцита и, в-третьих, КК может служить местом переупаковки продуктов хромосомной активности.

Во время оогенеза *T. castaneum* образуется кариосфера с развитой КК (Рис. 2, А), при этом КК имеет очень сложное строение и, вероятно, имеет важное значение для оогенеза *T. castaneum*.

2.4 Белок Y14 как составная часть комплексов

2.4.1 Комплекс связи экзонов (EJC)

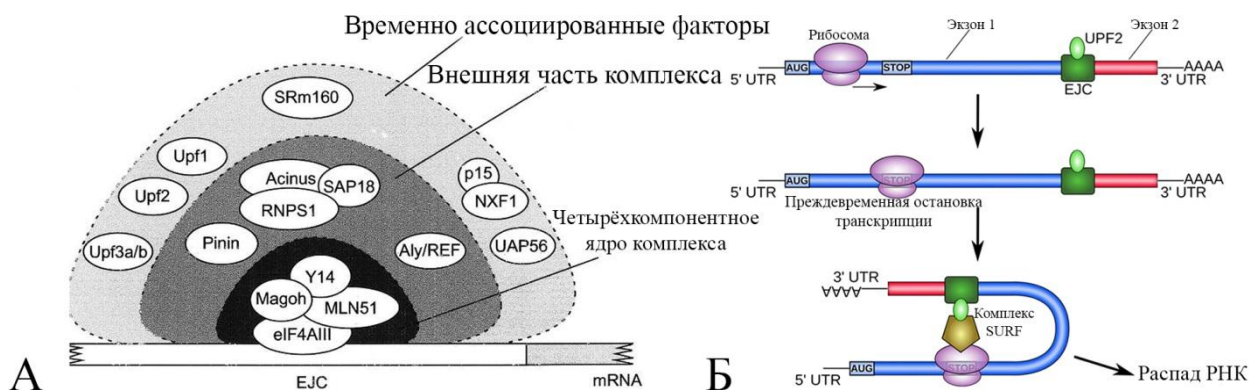


Рис. 3 Комплекс связи экзонов. **А** — Уровни организации EJC с четырёхкомпонентным ядром комплекса (Tange et al., 2005). **Б** — EJC-зависимый механизм деградации мРНК, содержащих преждевременный стоп-кодон (Kataoka et al., 2011)

Во время сплайсинга в месте соединения экзонов обычно присутствует специальный комплекс белков — комплекс связи экзонов (EJC) (Le Hir et al., 2000; Kim et al., 2001; Le Hir et al., 2001b). EJC присоединяется к пре-мРНК на 24 нуклеотида выше (upstream) места соединения экзонов, и отмечает места активности механизмов сплайсинга, т.е. те места, где находились интроны до созревания мРНК (Kataoka et al., 2000; Tretter et al., 1975; Kim et al., 2001). EJC состоит из четырёх коровых белковых компонентов: eIF4AIII, MLN51 и димера Y14/Magoh (Shibuya et al., 2004; Ballut et al., 2005; Tange et al., 2005). Во время постсплайсингового созревания мРНК состав EJC меняется. На каждом этапе своего функционирования комплекс включает множество дополнительных, временно ассоциирующихся с ним факторов (Рис. 3, А). EJC связывает процессинг пре-мРНК с событиями, происходящими позднее: экспортом из ядра, коррекцией избыточных стоп-кодонов (NMD) и локализацией в цитоплазме (Dreyfuss et al., 2002; Palacios, 2002). Например, компоненты EJC связаны с кодирующим регионом мРНК и усиливают эффективность трансляции (Nott et al, 2004) и экспорта мРНК (Le

Hir, et al., 2003; Wiegand et al., 2003; Nott et al., 2004; Gudikote et al., 2005; Giorgi, Moore, 2007; Diem et al., 2007; Ma et al., 2008). Кроме того, для некоторых генов продемонстрировано, что сплайсинг ведет к увеличению ядерного экспорта генов по сравнению с генами без интронов, так как фактор ядерного экспорта TAP/NXF1 взаимодействует с ядерным EJC (Strässer, Hurt, 2000; Stutz et al., 2000; Zenklusen et al., 2001; Le Hir et al., 2001a). Показано взаимодействие TAP/NXF1 с изолированными Y14 и Magoh *in vitro* (Kataoka et al., 2001). Комплекс EJC также является ключевым участником процесса деградации мРНК, содержащих преждевременный стоп-кодон (NMD). Коровые компоненты EJC остаются связанными с мРНК даже после экспорта в цитоплазму (Kataoka et al., 2000; Kim et al., 2001; Le Hir et al., 2001b; Kataoka et al., 2001; Le Hir et al., 2001). EJC в составе мРНК экспортируется в цитоплазму, где функционирует как эффектор для последующих событий регуляции метаболизма мРНК. Затем EJC разбирается, и его компоненты импортируются в ядро для дальнейшего использования.

На примере дрозофилы показано, что сплайсинг первого интрона в премРНК белка Oscar участвует в её локализации в задней части ооцита для образования первичного градиента этого белка материнского эффекта (van Eeden et al., 2001; Mohr et al., 2001; Hachet, Ephrussi, 2001; Palacios et al., 2004; Hachet, Ephrussi, 2004; Newmark, Boswell, 1994; Micklem et al., 1997). Присоединение мРНК Oscar к мембранным структурам происходит именно через EJC, остающийся в зоне соединения первого и второго экзонов этой мРНК (Hachet, Ephrussi, 2001). В этом процессе участвуют белки eIF4AIII, Barentsz (MLN51 у дрозофилы), Tsunagi (Y14 у дрозофилы) и Mago nashi (Mohr et al., 2001; Hachet, Ephrussi, 2001)

За последние годы биохимические и структурные исследования привели к лучшему пониманию механизмов, связанных со сборкой, функционированием и утилизацией EJC.

2.4.2 Деградация мРНК, содержащих преждевременный стоп-кодон (NMD)

Эукариотические клетки регулируют экспрессию кодирующих белки генов, изменяя количество и время жизни продукта гена (в основном РНК) в ответ на внутриклеточные и внеклеточные сигналы. Регуляция имеет первостепенное значение для дифференциации, пролиферации и оогенеза и позволяет организмам адаптироваться к новым условиям.

Ключевое значение для клетки имеет регуляция пост-транскрипционного уровня РНК. Она охватывает процессинг и экспорт мРНК, контроль, обновление, сайленсинг и локализацию. Известно, что эти процессы взаимосвязаны при помощи взаимодействия между множеством белков, которые присоединяются к мРНК и формируют большие мультимолекулярные комплексы, известные как мРНП (Moore, 2005; Dreyfuss et al., 1993).

Сплайсинг пре-мРНК — важнейший этап в процессе экспрессии генов многоклеточных, этот процесс необходим для удаления интронов из предшественника мРНК, т.е. для созревания мРНК. Сплайсосома, которая необходима для сплайсинга каждого интрона, привлекает к пре-мРНК различные белки, среди которых белок Y14.

Процесс экспрессии гена включает транскрипцию пре-мРНК РНК-полимеразой II, удаление интронов в процессе сплайсинга пре-мРНК, экзонирование 5' конца, удаление 3'-конца и его полиаденилирование, перемещение мРНК внутри ядра, а затем в цитоплазму и, наконец, трансляцию, или синтез белка на рибосомах. На всех стадиях мРНК-транскрипт существует в виде комплекса с различными связывающими РНК белками, состав мРНП динамично меняется (Dreyfuss et al., 2002; Krecic, Swanson, 1999; Shyu, Wilkinson, 2000). На некоторых этапах процессинга мРНК происходит контроль экспрессии и предотвращение неуместной или несвоевременной экспрессии генов (Hentze, Kulozik, 1999; Ho et al., 2002; Krecic, Swanson, 1999). Удаление интронов из пре-мРНК, т.е. собственно процесс сплайсинга, сопровождается изменением состава мРНП-комплекса.

Существует множество механизмов для увеличения точности процессинга мРНК (Ibba, Söll, 1999; Maquat, Carmichael, 2001). Одним из них является механизм деградации мРНК, содержащих преждевременный стоп-кодон (Nonsense Mediated Decay, NMD). Этот механизм состоит в распознавании кодонов, которые досрочно терминируют трансляцию (premature termination (nonsense) codons, PTC), и маркировании мРНК, содержащей такие кодоны, для последующей деградации (Maquat, 2004; Baker, Parker, 2004; Holbrook et al., 2004; Lejeune, Maquat, 2005; Conti, Izaurralde, 2005; Fasken, Corbett, 2005; Yamashita et al., 2005). NMD предотвращает трансляцию PTC-содержащей мРНК, которая может приводить к появлению усечённой версии белка с отсутствующим важным функциональным участком, либо с доминантно негативной активностью.

PTC могут возникать разными способами. Наиболее очевидными путями появления PTC являются несинонимичные мутации и мутации со сдвигом рамки считывания, находящиеся в кодирующих зонах экзонов. Другим источником PTC является запрограммированная перестройка ДНК. У млекопитающих наиболее изучена перестройка генов Т-клеточного рецептора (TCR) и генов иммуноглобулинов (Ig), которая необходима для увеличения репертуара антигенных рецепторов. В двух случаях из трёх такая перестройка ведёт к образованию мутации со сдвигом рамки считывания, которая активирует NMD ответ (Li, Wilkinson, 1998). Другой общий источник PTC — это ошибки при сплайсинге мРНК, включающие абберантный альтернативный сплайсинг (Culbertson, 1999; Frischmeyer, Dietz, 1999; Lejeune, Maquat, 2005; Maquat, 2004).

Механизм NMD (Рис. 3, Б) эволюционно консервативен и существует у всех эукариот, исследованных на сегодняшний день (Culbertson, 1999). Важную роль в процессе NMD играют три взаимодействующих фактора, которые также называют белками, располагающимися до рамки считывания (Up Reading Frame, UPF). Эти белки изначально были обнаружены у *Saccharomyces cerevisiae* и позже идентифицированы у высших эукариот (Cui

et al., 1995; Lee, Culbertson, 1995; Leeds et al., 1992). Один из этих белков, UPF1, является членом группы I семейства хеликаз, входит в состав комплекса SURF и рекрутируется на мРНК после распознавания стоп-кодона аппаратом трансляции (Kashima et al., 2006; Czaplinski et al., 1998). Быстрый распад РТС-содержащей РНК включается, когда возникает возможность взаимодействия белка UPF1 с двумя другими UPF белками — UPF2 и UPF3 (Рис. 3, Б). В клетках млекопитающих UPF2 и UPF3 являются частью EJC, который описан в предыдущей главе. Регуляция NMD осуществляется посредством фосфорилирования и дефосфорилирования белка UPF1. Белок SMG-1, изначально обнаруженный у *Caenorhabditis elegans*, фосфорилирует UPF1, а белки SMG-5, SMG-6, SMG-7 дефосфорилируют его (Anders et al., 2003; Grimson et al., 2004; Page et al., 1999). Полное описание NMD *C. elegans*, *D. melanogaster*, *S. cerevisiae* можно найти в обзорах (Baker, Parker, 2004).

2.4.3 Белок Y14

Белок Y14 впервые был обнаружен в качестве специфического посредника для белка импортина 51 (белок RanBP) при двугибридном анализе (Kataoka et al., 2000). Y14 — это челночный белок, который в основном обнаруживается в ядре, но присутствует и в цитоплазме (Kataoka et al., 2000). Этот белок размером 20 kDa содержит РНК-связывающий домен (RBD, также называемый RRM или RNP-домен). Y14 формирует гетеродимер с белком Magoh (Kataoka et al., 2001; Le Hir et al., 2001). Комплекс Y14/Magoh преимущественно ассоциирован со сплайсированной мРНК, с более низкой эффективностью этот комплекс связывается с пре-мРНК, интронами или генами, в которых отсутствуют интроны (Kataoka et al., 2000; Kataoka et al., 2001; Le Hir et al., 2001). Y14 и Magoh тесно связаны друг с другом, и импортируются в ядро в виде комплекса (Mingot et al., 2001). После формирования EJC и последующего экспорта из ядра в цитоплазму Y14 и

Magoh остаются связанными с мРНК до тех пор, пока не произойдет их удаление в процессе активной трансляции мРНК (Dostie, Dreyfuss, 2002).

У белка Y14 есть два перекрывающихся, но имеющих разные функции домена — NLS и NES, расположенные на N-конце (Рис. 15). Общий для NLS и NES участок Y14 назвали сигнальным ядерным доменом Y14 (YNS, Y14 nuclear signal). С-конец Y14, в частности аминокислоты с 148 по 159, отвечает за связывание с Magoh и сплайсированной мРНК, что показано при экспериментальной делеции С-конца. Мутанты Y14 по сайту связывания с Magoh остаются в ядре и не могут быть импортированы из ядра по YNS-зависимому пути (Kataoka et al., 2011).

Magoh — человеческий гомолог продукта гена *mago nashi* дрозофилы (Newmark, Boswell, 1994; Zhao et al., 1998). Это небольшой, очень консервативный белок размером 18 kDa, его последовательность не находится в родстве ни с какими из известных. Единичная мутация в локусе *mago nashi* ведет к фенотипу «без внуков» (*grandchildless*) у мух вследствие дефекта правильной локализации мРНК белка Oscar (Micklem et al., 1997; Newmark, Boswell, 1994; Newmark et al., 1997). При этой мутации задняя часть эмбриона мухи не развивается правильно, и у потомков особей, несущих эту мутацию, не образуются правильные яйцевые камеры. Белок Magoh содержит гидрофобный домен, который при определённых условиях закрывает сайт связывания белка Y14 с РНК, инактивируя его РНК-связывающую активность. Кроме того, Magoh содержит домены, с которыми могут связываться другие компоненты ЕКС, мРНК или адаптерные белки, используемые при транспорте мРНК или регуляции процессинга пре-мРНК (Lau et al., 2003).

Y14 и Magoh — универсальные белки и экспрессируются во всех тканях (Zhao et al., 1998). Структура комплекса Y14/Magoh предполагает, что Magoh ингибирует возможность Y14 взаимодействовать с мРНК при отсутствии сплайсинга. Компоненты систем сплайсинга могут открывать комплекс Y14-

Magoh и активировать поверхности, имеющие высокую аффинность к 5'-концу мРНК.

В настоящей работе для локализации челночного белка Y14 мы использовали конструкцию, кодирующую химерный белок, содержащий последовательность белка Y14 и специфическую последовательность Мус. При помощи антител к Мус-эпитуопу отслеживали перемещение Y14 в ядре ооцита *T. castaneum*.

3 Материал и методика

3.1 Объект

Исследовали ядра ооцитов малого булавоусого хрущака *Tribolium castaneum* (Herbst.) (Coleoptera–Polyphaga: Tenebrionidae). Для сравнения привлечён материал по ядру ооцитов большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* L. из того же семейства. Культуру *T. castaneum* содержали при 28 °C на субстрате, состоящем по весу из 60 % пшеничной муки, 35 % овсяных хлопьев и 5 % высушенных пекарских дрожжей. Культуру *T. molitor* содержали при комнатной температуре на субстрате из овсяных хлопьев с добавлением свежей моркови.

Для выделения ооцитов отбирали внешне здоровых и активных самок. Яичники препарировали в физиологическом растворе для насекомых (0.75 % NaCl, 0.035 % KCl, 0.021 % CaCl₂) или в среде ExCell420 (SAFC Bioscience, США) с добавлением 10 %-ной эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Hyclone, США) (Goodman et al., 2012). Яичник разделяли на отдельные овариолы (анатомические и функциональные единицы женской гонады насекомых).

3.2 Методы молекулярной биологии

3.2.1 Экстракция мРНК

Тотальную мРНК получали из личинок. После извлечения из субстрата, личинки выдерживали 2 сут в чашке Петри с подложкой из фильтровальной бумаги, замораживали в жидком азоте, механически мацерировали, затем проводили экстракцию РНК с использованием TRI-REAGENT (Sigma Aldrich, США) в соответствии со стандартным протоколом фенолгуанидинтиоцианатхлороформной экстракции (Sambrook, Russel, 2001) и рекомендациями производителя.

3.2.2 Электрофорез ДНК и РНК

Для горизонтального электрофореза ДНК использовали 2 %-ный агарозный гель, приготовленный на буфере TAE. Для анализа РНК использовали электрофорез в денатурирующих условиях (Sambrook, Russel, 2001). Для выделения и очистки необходимых фрагментов ДНК использовали набор Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (ThermoScientific, США). Для определения характеристик РНК, синтезированной *in vitro*, использовали капиллярный электрофорез (Agilent 2100 Bioanalyzer, США).

3.2.3 Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Для проведения ПЦР использовали полимеразы Taq (ThermoScientific, США) и Pfu (ThermoScientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Полимеразу Taq использовали преимущественно для проведения промежуточных контрольных реакций. Все операции, связанные с клонированием, проводили с использованием полимеразы Pfu. кДНК синтезировали с использованием набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, США) с соблюдением всех условий, рекомендованных производителем. Для проведения ПЦР и ОТ-ПЦР использовали термоциклер Eppendorf Mastercycler personal.

3.2.4 Клонирование

В работе использовали следующие плазмидные вектора *E. coli*: PTZ57R/T (ThermoScientific, США) — ТА клонирование; pcDNA 3.1 Мус-His(A) (Invitrogen, США) — введение последовательности Мус-эпитопа, экспрессионный контроль на культуре НЕК293; PTZ19R (ThermoScientific, США) — введение в последовательность промотора Т7, транскрипция *in vitro*; pBMC (Murashev et al., 2007) — экспрессия несплайсированного гена в культуре клеток человека НЕК293. Использовали следующие рестриктазы: BamHI, EcoRI, XhoI, KpnI, NheI, NotI (ThermoScientific, США). Все промежуточные конструкции подвергали контрольному секвенированию.

После проведения ПЦР фрагмент лигировали в вектор PTZ57R/T (ThermoScientific, США) по выступающим на концах дезоксиаденозиновым остаткам амплифицированных фрагментов ДНК (ТА-клонирование) с использованием лигазы T4 по стандартному протоколу (Sambrook, Russel, 2001). Проводили рестрикцию фрагмента и вектора соответствующими рестриктазами, лигирование проводили также лигазой T4. Трансформацию клеток *E. coli* (штамм DH5a) проводили с помощью электропоратора ГВИ11 (Малое предприятие молодежного центра ЛГТУ, 1990). Эффективность трансформации составила 10^9 трансформированных клеток на 1 мкг ДНК.

3.2.5 Транскрипция *in vitro*

Для получения *in vitro* 5'-кэпированной мРНК использовали набор TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (ThermoScientific, США) с добавлением Ribo m₇G Cap Analog (Promega, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Известно, что добавление в конструкцию 5'-кэпа значительно увеличивает эффективность синтеза *in vitro* модифицированной мРНК (Drummond et al., 1985). Синтезированную *in vitro* мРНК очищали при помощи набора RNAqueous (Ambion, США) и хранили при –80 °C.

3.2.6 Методики биоинформатики

Все генно-инженерные манипуляции предварительно моделировали *in silico*. Данные о последовательностях ДНК, кодирующих белки *T. castaneum*, получали из базы данных NCBI. Использовали программные пакеты Vector NTI (Invotrogen, США), BioEdit (Tom Hall, США) и Geneious (Biomatters, Новая Зеландия). Подбор праймеров и внесение необходимых для генно-инженерных манипуляций сайтов рестрикции (Табл. 1, включённые сайты) проводили при помощи программы Primer3 (Rozen, Skaletsky, 2000).

Табл. 1 Список праймеров

Название праймера	Последовательность (5'–3')	Включённые сайты
006-XhoI-RNA-For	TTCTCGAGATGGCAG ATG TTTTGGACA	XhoI
007-KpnI-RNA-Rev	TAGGTACCGTGTCTCCTTGCACGTTTC	KpnI
020-BamH1-RNA-Forv	GAGGATCCATGGCAGATGTTTTGGACA	BamH1
011-EcoRI-Stop-Myc-Rev	TCGAATTCTCAATTCAGATCCTCTTCTGAGATG	EcoRI, TGA(stop)
M13(-20) Forv	GTAACACGACGGCCAGT	
M13(-26) Rev	GGAAACAGCTATGACCA	
001-DnaNheI-Forv	GTGCTAGCCACC ATG GCAGATGTTTTGGAC	NheI
002-DnaNot-Rev	ACGCGGCCGCTCAGTGTCTCCTTGCACG	NotI

Примечание: Красным выделены стартовые кодоны, стоп-кодон подчеркнут.

3.3 Микроинъекции

Микроинъекцию ооцитов *T. castaneum* синтезированной *in vitro* 5'-кэпированной мРНК проводили в среде ExCell 420 (Safcbioscience, США), содержащей 10 % FBS (HyClone, США). Использовали микроинъектор Eppendorf 5242, инвертированный микроскоп Leica DM IRB, оснащённый микроманипулятором Narishige, и капилляры Femtotips II (Eppendorf). Инъецированный материал до фиксации инкубировали в течение 3—4 ч при 28 °C.

3.4 Флуоресцентная микроскопия

Для одновременного выявления ДНК и РНК в ядре ооцитов *T. castaneum* поздних стадий развития использовали метод прижизненного окрашивания акридином оранжевым (Kronvall, Myhre, 1977). Использовали смесь 20 мМ цитрат-фосфатного буфера № 1, pH 3.0 с добавлением 0.1 мМ EDTA, 0.2 М сахарозы и 10 мМ цитрат-фосфатного буфера № 2, pH 3,8 с добавлением 0.1 % Triton X-100, 0.1 М NaCl в соотношении 1:1. В смесь буферов вносили изолированное ядро ооцита *T. castaneum*. Результат окрашивания наблюдали при помощи светооптического микроскопа Leica DM 6000 B (Heidelberg, Германия).

3.5 Иммунофлуоресцентное окрашивание

Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили на давленных препаратах, приготовленных по описанной методике (Hulsebos et al., 1984). Изолированные овариолы помещали на покровное стекло, которое заранее покрывали силиконом Sigmacote (Sigma, США), в каплю среды объёмом примерно 5 мкл, накрывали предметным стеклом Polysine® (Menzel, Германия) и надавливали, избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой. При этом в большинстве случаев ядро выдавливается из ооцита и перемещается в свободное от остатков цитоплазмы место. Препараты замораживали в жидком азоте, лезвием удаляли покровное стекло и замороженный препарат фиксировали в растворе 2 % формальдегида в 96 %-ном этаноле в течение 30 мин, промывали в 70 %-ном этаноле в течение 5 мин, затем трижды промывали PBS.

Перед обработкой в растворе первичных антител для предотвращения их неспецифического связывания препараты инкубировали в течение 10 мин в 10 %-ном растворе эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, приготовленном на PBS (Short Protocols in Cell Biology, 2003). Затем препараты помещали в раствор первичных антител (АТ) (Табл. 2) и инкубировали во влажных камерах при 4°C в течение ночи.

После обработки первичными антителами и отмытки в PBS от несвязавшихся антител препараты инкубировали 1.5 ч в растворе вторичных АТ (кроличьи, козьи или ослиные антитела против иммуноглобулинов мыши, кролика или козы), конъюгированных с различными флуорохромами (FITC, Alexa-488, Alexa-568 или Alexa-594). После отмытки в PBS для выявления ДНК препараты либо окрашивали 2—3 мин в PBS, содержащем 1 мкг/мл ДНК-специфичного флуорохрома To-Pro-3 (Molecular Probes) и затем заключали в среду Vectashield (Vector Laboratories, США), либо непосредственно заключали в эту среду, содержащую 1 мкг/мл DAPI. Препараты просматривали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica SP5 (Heidelberg, Германия) с

использованием полупроводниковых Ar-UV (405 нм), Ar (488 нм) и HeNe (543 нм и 633 нм) лазеров и 63× объектива (цифровая апертура 1.32). Совмещённые изображения получали с помощью программы ImageJ 1.37a. Относительную яркость и контраст регулировали с помощью Adobe Photoshop.

Табл. 2 Антитела, использованные в работе

Название	Распознаваемый антиген	Тип	Применение, концентрация	Источник
9E10	Мус-эпитоп	ММон	ИЭМ*, раз.1:50	Evan et al., 1985
Y12	Симметричные диметиларгинины (sDMA) — “Sm-эпитоп” мяРНК	ММон	ИФ, ИЭМ, без раз.	Lerner et al., 1981
030	Двухцепочечная ДНК	ММон	ИФ, ИЭМ, раз.1:300	Chemicon
1501R	Актин	ММон	ИЭМ, раз. 1:100	Chemicon
K121	2,2,7-триметилгуанозиновый (TMG) кЭП мяРНК	ММон	ИФ, ИЭМ, 1 мкг/мл	Krainer, 1988
αSC35	SC35	ММон	ИФ, ИЭМ, 2,5 мкг/мл	Fu, Maniatis, 1990
11G5	Человеческий рекомбинантный слитый белок REF/Aly	ММон	ИФ, ИЭМ, раз.1:50	Abcam
R3	С-концевой участок молекулы коилина дрозофилы	КРПол	ИФ, ИЭМ, раз.1:1.000	Liu et al., 2009
N-15	N-концевой участок гЯРНК А1 человека	КОПол	ИФ, раз.1:50	Santa Cruz Biotech, Inc.
H-120	участок с 1 по 120 аминокислоту NXF1/TAP человека	КРПол	ИЭМ, раз.1:10	Santa Cruz Biotech, Inc.
C-20	С-концевой участок Y14 человека	КОПол	ИЭМ, раз.1:50	Santa Cruz Biotech, Inc.
CTD	Гиперфосфорилированный CTD РНК-полимеразы II	КРПол	ИЭМ, раз.1:1.000	Kim, Dahmus, 1986
SI-1	участок с 1 по 120 аминокислоту TBP	КОПол	ИЭМ, раз.1:10	Santa Cruz Biotech, Inc.
N-15	TFIIH	КОПол	ИЭМ, раз.1:10	Santa Cruz Biotech, Inc.
M-20	Ламин В	КОПол	ИФ, ИЭМ, раз.1:50	Santa Cruz Biotech, Inc.

*Сокращения в таблице: ИФ – иммунофлуоресценция, ИЭМ – иммуноэлектронная микроскопия, ММон — мышинные, моноклональные, КРПол — кроличьи, поликлональные, КОПол — козы, поликлональные, раз. – разведение.

3.6 Иммуноэлектронная микроскопия

Овариолы фиксировали в растворе, содержащем 4 % формальдегида и 0.5 % глутаральдегида на PBS в течение 2 ч. при комнатной температуре. Затем дофиксировали в 2 %-ном формальдегиде на PBS в течение ночи при 4 °С. После промывки в PBS, который содержал 0.05 М NH_4Cl , и последующего обезвоживания материал заключали в смолу LR White (medium grade, Sigma, США) (Trauner, Büning, 2007; Баталова, Боголюбов, 2013). Ультратонкие срезы готовили с помощью ультрамикротомы Reichert-Jung и затем собирали на никелевые сетки.

Ультратонкие срезы обрабатывали в течение 10 мин в блокирующем буфере, содержащем 0.5 % желатина (Sigma) и 0.02 % Твин 20 на PBS, pH 7.4, затем инкубировали в течение ночи в растворе первичных АТ (Табл. 2) во влажной камере при 4 °С, после этого инкубировали в растворе вторичных антител (Aurion, BBIInternational или Ted Pella, США), конъюгированных с коллоидным золотом (частицы 10 и 15 нм), разведённых в соотношении 1:10—1:20.

В случае использования АТ 9E10 после отмывки в TBST срезы инкубировали в растворе биотинилированных козьих антител против иммуноглобулинов мыши (Vector Laboratories, США), разведённых TBST в соотношении 1:50, в течение 1 ч. при комнатной температуре. После отмывки в TBST срезы обрабатывали раствором стрептавидина, конъюгированного с 15-нанометровыми частицами коллоидного золота (Aurion) и разведённого TBST в соотношении 1:20, в течение 1 ч при комнатной температуре. Материал контрастировали насыщенным спиртовым раствором уранилацетата в течение 10 мин и просматривали с помощью электронного микроскопа Libra 120 при ускоряющем напряжении 80 кВ.

4 Результаты

4.1 Динамика ядерных структур ооцитов *Tribolium castaneum*.

Кариосфера и её капсула

Ооциты *T. castaneum* развиваются в мероистических яичниках телотрофного типа, дифференцировка на ооциты и питающие клетки происходит на стадиях личинки и куколки (Trauner, Büning, 2007). Стадии развития ооцитов *T. castaneum* охарактеризовали на основе номенклатуры, предложенной для *Tenebrio molitor* (Ullmann, 1973) со сходным строением женской половой системы, сходными циклами размножения и развития. Ядра ооцитов этих двух видов на стадии диплотены профазы мейоза различаются тем, что хромосомы *T. molitor* стягиваются в плотную кариосферу, хроматиновый «клубок», а в кариосфере *T. castaneum* хромосомы конденсируются, но различимы, и присутствует развитая КК.

Выделено 8 стадий развития ооцитов *T. castaneum* (Рис. 4, Табл. 3), которые охватывают периоды превителлогенеза и вителлогенеза. Кариосфера и КК наблюдаются в ядре ооцита до конца его роста. Их полная разборка происходит только после оплодотворения и перехода к редукционному делению.

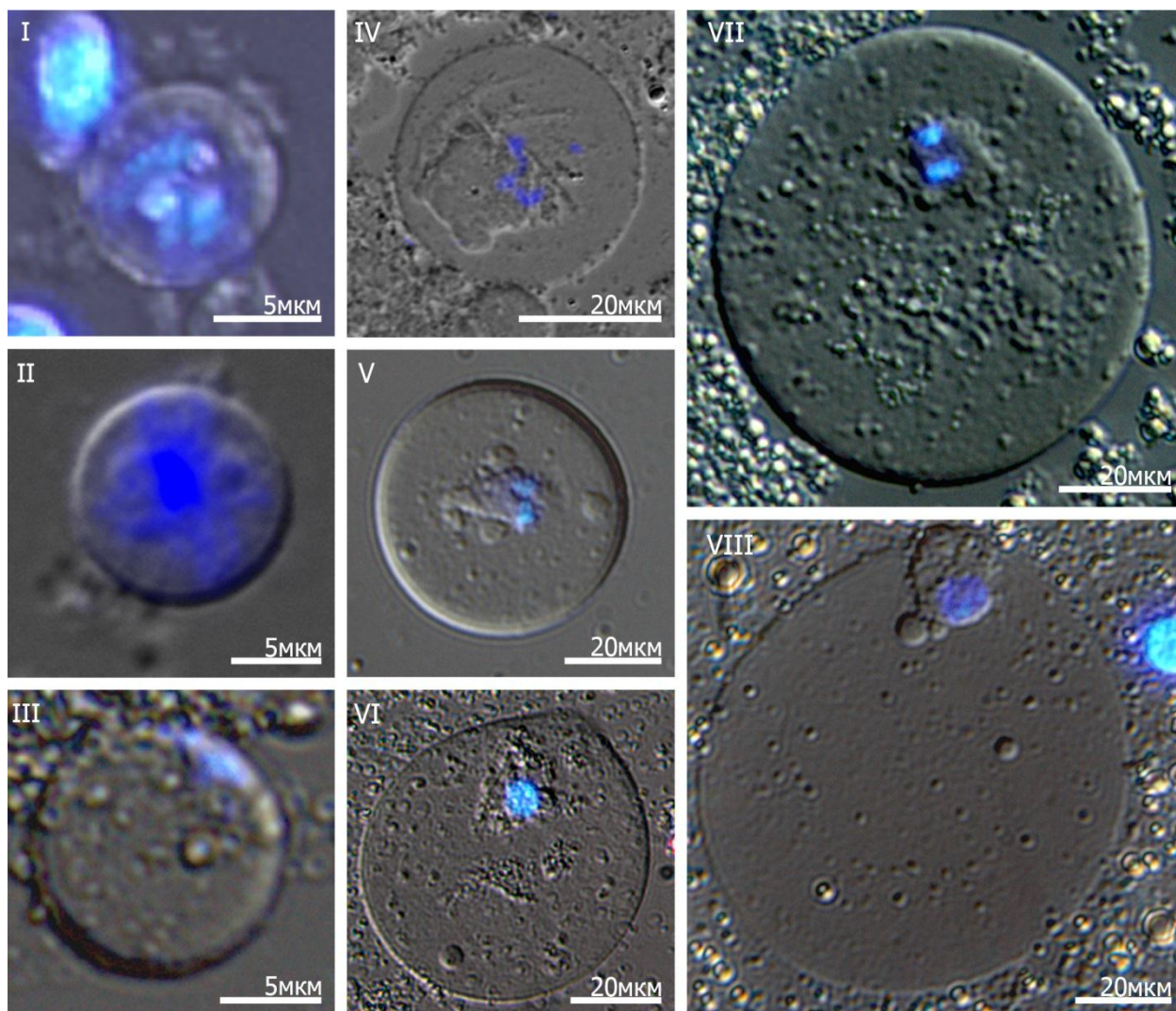


Рис. 4 Стадии развития ооцита *T. castaneum*. Покоящийся ооцит стадии I и изолированные ядра ооцитов стадий II–VIII на давленных препаратах. Стадии I–V — превителлогенез, стадии VI–VIII — вителлогенез.

Табл. 3 Стадии развития ооцита *T. castaneum* и динамика ядерных структур

Стадия	Стадия развития ооцита	Размер ядра, мкм	Признаки	Характеристики стадии на основе динамики ядра.
Диплогена профазы I мейоза	Превителлогенез	I	Первичные, превителлогенные ооциты в состоянии покоя располагаются в задней части гермария. Их размер не отличается от размера питающих клеток.	При окрашивании DAPI хромосомы плохо различимы.
		II	Ооциты располагаются в транзитной области («шейке») между гермарием и вителлярием. Ооцит различим в массе префолликулярных клеток. Начинается рост цитоплазмы ооцита.	Хромосомы сильно деконденсированы и занимают весь объём ядра.
		III	Ооцит круглой формы, продолжает расти. Префолликулярные клетки располагаются вокруг ооцита и формируют внешний фолликулярный слой. Фолликулы выравниваются.	Ядро располагается в центре клетки. Хромосомы собираются в несколько групп. Появляются первые экстрахромосомные элементы КК
		IV	Ооцит значительно увеличивается в размере. Фолликулярный слой полностью сформирован.	Хромосомы собираются в ограниченном участке ядра и формируют кариосферу, включающую экстрахромосомную капсулу.
		V	Происходит интенсивный рост цитоплазмы ооцита, фолликулярные клетки образуют цилиндрический эпителий.	Ядро по-прежнему располагается в центре клетки. Морфогенез кариосферы и ее капсулы продолжается.
	Вителлогенез	VI	Ранний вителлогенез. Начинается отложение желтка. Ооцит быстро увеличивается в размере. Фолликулярные клетки становятся кубическими. Образуются контакты щелевого типа.	Ядро располагается в центре клетки. КК хорошо выражена и имеет сложное строение.
		VII	Средний вителлогенез. Активное накопление желтка.	Ядро перемещается в среднедорсальную часть ооцита.
		VIII	Поздний вителлогенез. Фолликулярные клетки уплощаются, формируя плоский эпителий. Накопление желтка прекращено. Фолликулярные клетки начинают секретировать хорион.	Кариосфера и её капсула уменьшаются, структура капсулы упрощается.

Примечание: размеры ядер определяли на давленных препаратах.

4.2 Ядерные тельца ооцитов *Tribolium castaneum*

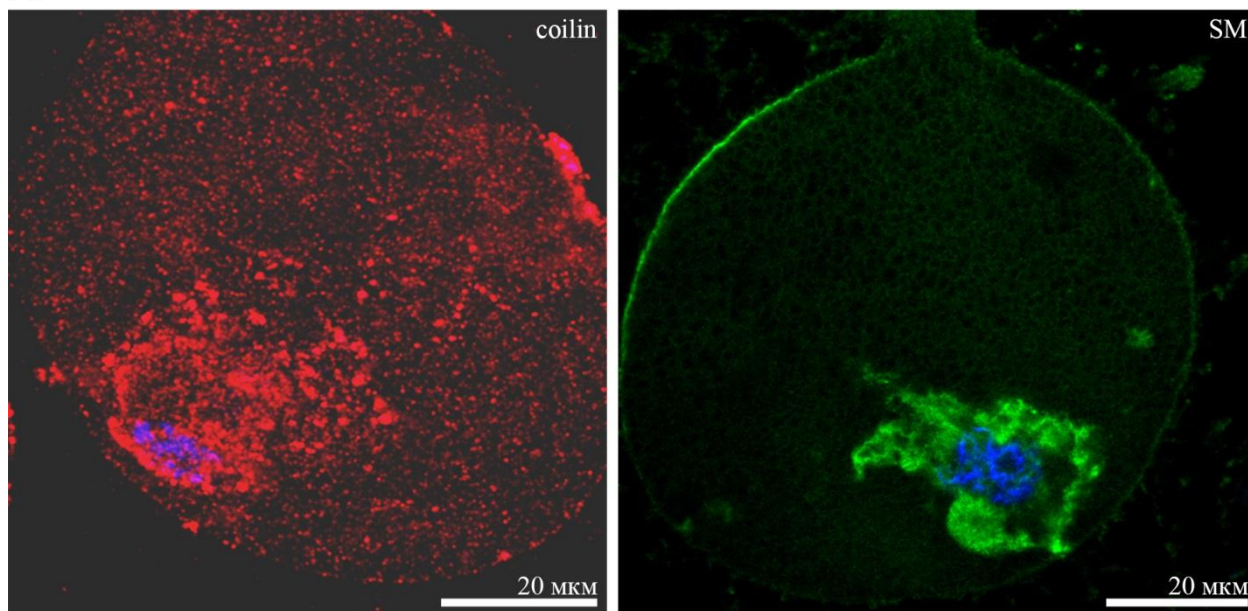
В ядре ооцита *T. castaneum* на стадии диплотены профазы мейоза присутствуют многочисленные экстрахромосомные тельца. Некоторые из них связаны с КК с внешней её стороны, другие свободно рассредоточены в нуклеоплазме. Мы выделили три типа экстрахромосомных телец (Bogolyubov, ... Kiselyov, Stepanova, 2013).

Тельца 1-го типа состоят из плотно упакованных фибрилл примерно 5 нм толщиной, имеют среднюю электронную плотность и достигают в диаметре 0.2—0.4 мкм (Рис. 5). Они содержат коилин и мяРНП. мяРНП выявлены с помощью АТ Y12 против симметричных диметиларгининов (sDMA), характерных для Sm-белков мяРНП (Brahms et al., 2000), и АТ K121 против 2,2,7-триметилгуанозинового (ТМГ) кэпа, характеризующего 5'-конец молекул ряда мяРНК (Will, Lührmann, 2001). По этим признакам тельца 1-го типа могут соответствовать тельцам Кахала (ТК) и (или) тельцам гистоновых локусов (ТГЛ). Мы никогда не наблюдали тельца 1-го типа в ассоциации с хроматином, так как они всегда отделены от него КК, и считаем их аналогами ТК.

Тельца 2-го типа представляют собой морфологически сложные образования размером 0.4–0.7 мкм. Они содержат электронноплотные фибриллярные зоны (фибриллы толщиной около 10 нм), а также фибриллярные области средней электронной плотности (Рис. 6). Последние состоят из перекрученных нитей и обогащены ламином В, похожие структуры найдены в КК. Характерная особенность телец — положительная реакция с антителами к фактору сплайсинга SC35, который рассматривают как маркер ядерных “speckles” (КИГ) (Spector et al., 1991). Типичные КИГ соматических клеток млекопитающих, содержащие в своём составе SR-белки (в частности, SC35), состоят из гранул диаметром 20—25 нм, соединённых тонкими фибриллами, в результате чего образуется цепочка гранул, напоминающая «бусы на нитке» (Spector, Lamond, 2011). В отличие от КИГ млекопитающих SC35-содержащие тельца *T. castaneum* не имеют

гранулярной составляющей. Ядерные тельца, отличные от «классических» КИГ по морфологическим признакам, но содержащие белок SC35, наблюдали в ооцитах и других видов насекомых (Bogolyubov, Parfenov, 2008).

А



Б

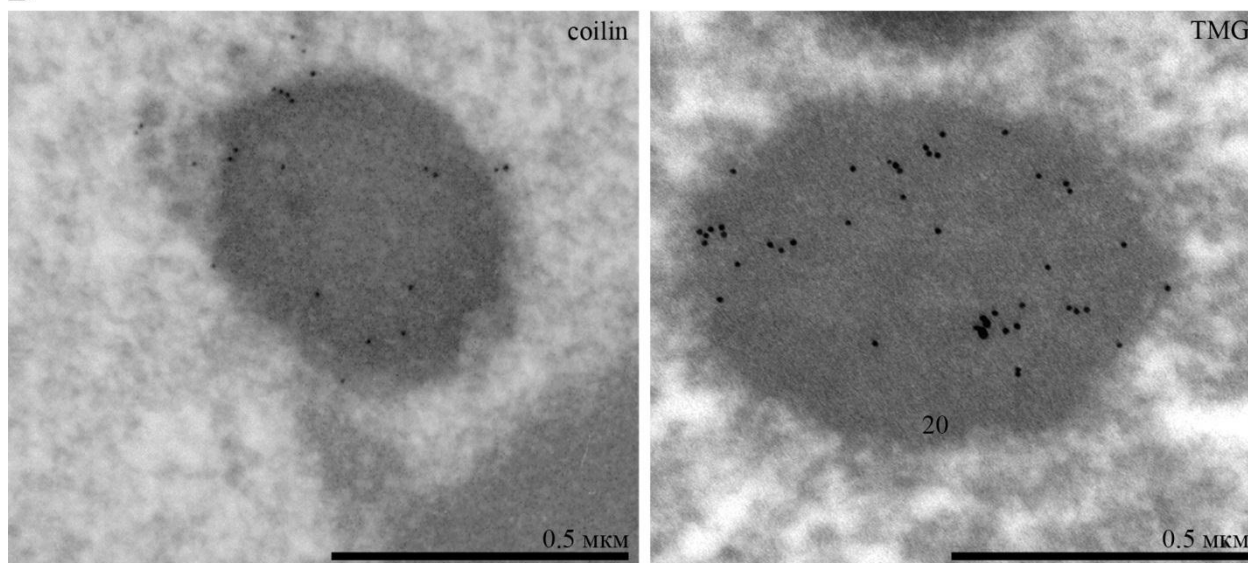
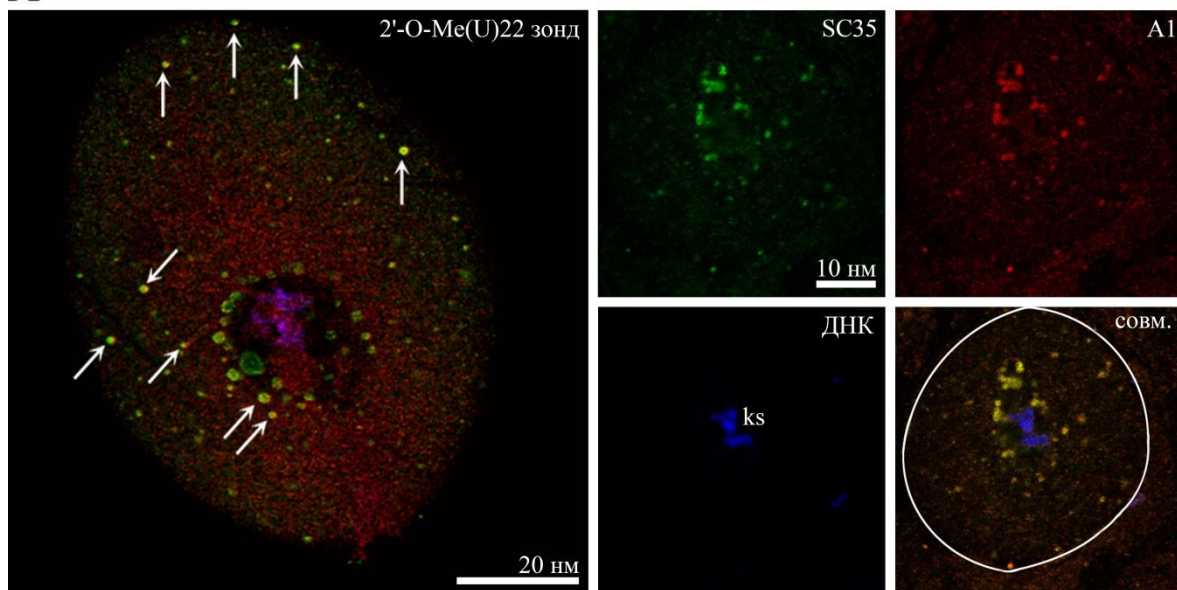
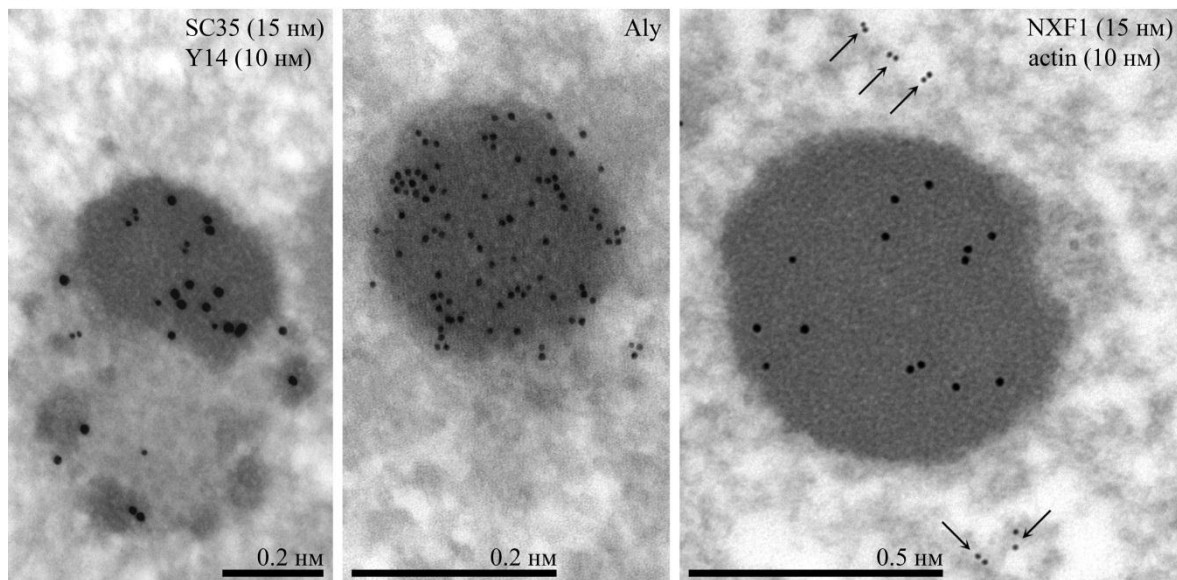


Рис. 5 Коилинсодержащие тельца (*тельца I-go tupa*) в ядре ооцита *T. castaneum*. **Панель А, слева** — ядро ооцита *T. castaneum*, обработанное антителами (красный) к коилину, ДНК докрашена DAPI (синий), **справа** — ядро ооцита жука, обработанное антителами к Sm-эпиту (зелёный). **Панель Б, слева** — иммуноэлектронная микроскопия коилинсодержащего тела, срез обработан антителами к коилину, конъюгированными с коллоидным золотом, **справа** — иммуноэлектронная микроскопия коилинсодержащего тела, срез обработан антителами к TMG, конъюгированными с коллоидным золотом.

A



Б



В

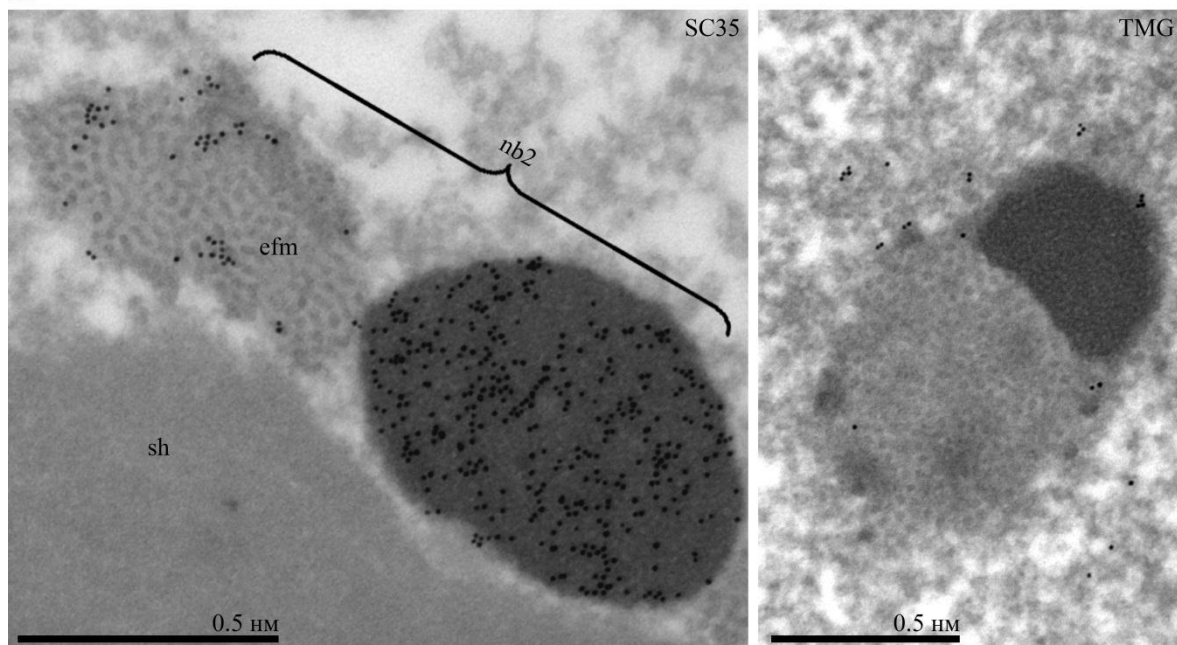


Рис. 6 SC35-содержащие тельца (*тельца 2-го типа*) в ядре ооцита *T. castaneum*. **Панель А, справа** — ядро ооцита *T. castaneum*, обработанное антителами к белку SC35 (зелёный) и белку A1 (красный), ДНК докрашена DAPI (синий), белой линией отмечена граница ядра, **слева** — ядро ооцита *T. castaneum*, обработанное антителами к белку SC35 (зелёный) и РНК (красный), после введения в ооцит зонда 2'-O-Me(U)₂₂, ДНК докрашена DAPI (синий). **Панель Б, слева** — иммуноэлектронная микроскопия коилинсодержащего тела, срез обработан антителами к SC35 (15 нм) и Y14 (10 нм), конъюгированными с коллоидным золотом, **в центре** — иммуноэлектронная микроскопия SC35-содержащего тела, срез обработан антителами к Aly, конъюгированными с коллоидным золотом, **справа** — иммуноэлектронная микроскопия коилинсодержащего тела, срез обработан антителами к NXF (15 нм) и актину (10 нм), конъюгированными с коллоидным золотом. **Панель В, слева** — иммуноэлектронная микроскопия SC35-содержащего тела, срез обработан антителами к SC35, конъюгированными с коллоидным золотом, **справа** — иммуноэлектронная микроскопия коилинсодержащего тела, срез обработан антителами к SC35, конъюгированными с коллоидным золотом.

Нехарактерной для типичных КИГ особенностью SC35-содержащих доменов *T. castaneum* является отсутствие в их составе ТМГ-кэпированных мРНК, что выявляется на ультраструктурном уровне. Ряд других молекулярных компонентов SC35-содержащих ядерных телец ооцитов *T. castaneum* оказался сходным с таковым типичных КИГ.

В тельцах 2-го типа на стадиях VI и VII выявлены поли(А)⁺-РНК и факторы, связанные с метаболизмом мРНК. Микроинъекции в ооплазму конъюгированного с флуорохромом TAMRA метилолигонуклеотидного зонда 2'-O-Me(U)₂₂, комплементарного поли(А)-«хвосту» РНК, выявили мечение практически всех SC35-содержащих телец. Чтобы понять, связан ли SC35-белок с поли(А)⁺-РНК в местах их колокализации, в качестве контроля препараты обрабатывали нуклеазой S7, расщепляющей поли(А)-«хвосты», с последующим окрашиванием антителами к SC35. Такая обработка не оказала влияния на паттерн распределения белка SC35.

Многие SC35-содержащие ядерные тельца ооцитов *T. castaneum* на стадии V содержат коровый белок A1 гетерогенных ядерных РНП (гяРНП, или hnRNP). Мы показали присутствие гяРНП A1 в SC35-доменах и в ооцитах *T. molitor* (Боголюбов, Киселёв и др., 2012б). Белок A1 гяРНП вовлечён во многие ключевые процессы, происходящие в ядре, включая экспорт мРНК (He, Smith, 2009). Он тесно ассоциирован с несколькими другими коровыми белками гяРНП, которые вместе формируют гяРНП-

комплекс, участвующий в посттранскрипционной модификации мРНК (Dreyfuss et al., 1993; He, Smith, 2009).

В SC35-доменах ооцитов *T. castaneum* на стадиях IV и V обнаружены белки комплекса соединения экзонов (exon junction complex, EJC): Y14, Aly и временно ассоциирующийся с EJC белок NXF1. Белок-адаптер Aly выполняет роль связующего звена между сплайсингом и экспортом пре-мРНК и, в частности, локализуется в КИГ соматических клеток (Zhou et al., 2000). Белки Y14 и NXF1 наблюдали в КИГ клеток линии MCF-7 (Schmidt et al., 2006). Вместе с NXF1 белок Y14 участвует в экспорте мРНК из ядра в цитоплазму (Stutz et al., 2000).

Тельца 3-го типа отличаются от КИГ и ТК большими размерами (3–5 мкм в диаметре) и правильной округлой формой. Природу этих телец определить не удалось, они не реагировали ни с одним из имеющихся в распоряжении АТ.

Основные антигены, локализованные на светооптическом и (или) ультраструктурном уровне в том числе в составе ядерных телец 1-го и 2-го типов ооцитов *T. castaneum*, перечислены в табл. 3.

4.3 Транскрипционная активность хромосом, собранных в кариосферу

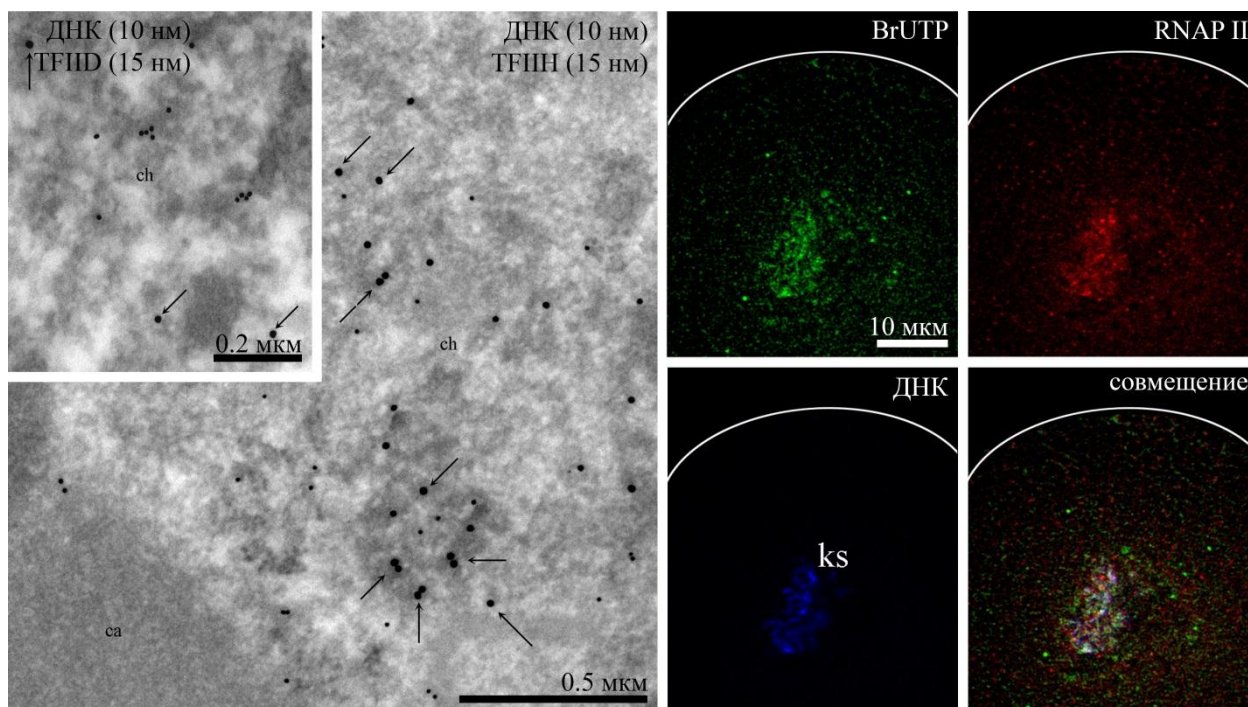


Рис. 7 Перихроматиновый компартмент между кариосферой и капсулой кариосферы. **Левая панель (сверху)** — иммуноэлектронная микроскопия капсулы кариосферы, срез обработан антителами к ДНК (10 нм) и TFIIID (15 нм), конъюгированными с коллоидным золотом. **Левая панель (снизу)** — иммуноэлектронная микроскопия капсулы кариосферы, срез обработан антителами к ДНК (10 нм) и TFIIH (15 нм), конъюгированными с коллоидным золотом. **Правая панель** — ядро ооцита *T. castaneum*, обработанное антителами к BrUTP (зелёный), RNAPII (красный), ДНК докрашена DAPI (синий), ооцит микроинъецирован BrUTP, белой линией отмечена граница ядра.

В период существования кариосферы в ядре ооцита *T. castaneum* не наблюдается полной конденсации хроматина, в отличие от представителя того же семейства *T. molitor* (Боголюбов, Киселёв и др., 2012б), у которого показано отсутствие синтеза РНК в ооцитах в конце периода роста (Bogolyubov, 2007). Эти данные могут свидетельствовать о неполной инактивации генома ооцита *T. castaneum*. Для проверки этого предположения в ооцит на разных стадиях инъецировали бромдезоксиуридинтрифосфат (BrUTP). На стадиях IV и V с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии регистрировали включение BrUTP в перихроматиновой области кариосферы (Рис. 7). В экспериментах по одновременному иммуноцитохимическому окрашиванию ядер ооцитов, инъецированных BrUTP, с помощью АТ против гиперфосфорилированной (элонгирующей) формы РНК-полимеразы II,

ТАТА-связывающей субъединицы базального фактора транскрипции TFIID (ТВР) и транскрипционного фактора TFIIN также выявлено окрашивание перихроматиновой области кариосферы (Рис. 7). Эти данные подтверждают факт неполной инактивации генома *T. castaneum* в период существования кариосферы и сохранение в этот период остаточной транскрипции.

4.4 Компоненты капсулы кариосферы

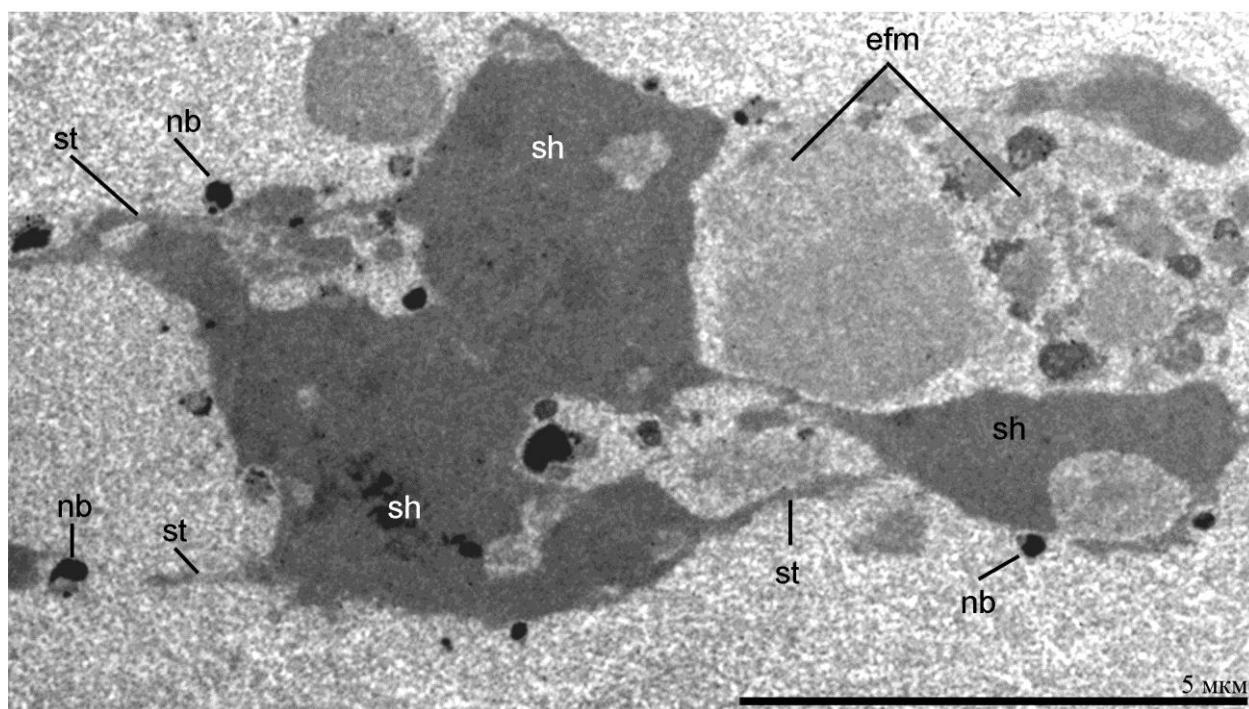


Рис. 8 Электронная микроскопия участка кариосферы *T. castaneum* с развитой капсулой. sh — материал капсулы; st — тяжи (strands), efm — перекрученные филаменты (entangled filamentous material), nb (nuclear bodies) — ядерные тела.

На Рис. 8 представлена хорошо развитая капсула кариосферы, которая состоит из трёх типов структур: электронно-плотной “капсулы” (sh), содержащей F-актин, фибриллярных тяжей (st), также содержащих актин и образующих поперечно-полосатые пучки, и перекрученных филаментов, содержащих ламин В. Кроме того, в области капсулы всегда обнаруживают несколько связанных с ней ядерных тел. Среди этих тел были обнаружены коилин- и SC35-содержащие домены (Bogolyubov,... Kiselyov, Stepanova, 2013).

Предполагают, что КК является своеобразно организованной частью ядерного матрикса (Gruzova, Parfenov, 1993; Грузова и др., 1995). Мы обнаружили, что при окрашивании ядер ооцитов *T. castaneum* родамин-фаллоидином в составе КК выявляется фибриллярный актин (F-актин). Иммунофлуоресцентные и иммуноэлектронные эксперименты с АТ против актина подтвердили его присутствие в материале КК (Рис. 9, А). АТ связываются с электронноплотным компонентом КК и тяжами. Тяжи

появляются на стадии III оогенеза и состоят из поперечно исчерченных нитей толщиной 20 нм, уложенных в составе тяжа в несколько рядов. Позднее эти тяжи образуют КК.

Одним из компонентов КК оказался белок класса промежуточных филаментов — ламин В (Рис. 9, Б). Он выявлен в связи с «перекрученными филаментами» (entangled filamentous material) КК — материалом, присутствующим также в составе телец 2-го типа (SC35-содержащих доменах). Таким образом, в КК ооцитов *T. castaneum* найдены структурные белки ядра, что подтверждает предположение о том, что КК является модификацией ядерного матрикса.

Прижизненное окрашивание ядер ооцитов акридиновым оранжевым продемонстрировало присутствие в КК значительных количеств РНК (Рис. 10). Оказалось, что по крайней мере часть этих РНК представляет собой мяРНК в виде мяРНП. Предположение о том, что в КК могут присутствовать мяРНП, проверили, используя АТ Y12 к Sm-эпитуру мяРНП (sDMA) и K121 против ТМГ-кэпа мяРНК (Рис. 5, Рис. 10). Эти антигены выявлены в КК как на светооптическом, так и на электронно-микроскопическом уровне (Боголюбов, ... Киселёв, Парфенов, 2012а). Сходная локализация ТМГ-кэпированных мяРНК в КК ранее была обнаружена в ооцитах другого вида насекомых — долгоносика *Anthonomus pomorum* (Świątek, Jaglarz, 2004).

Удивительно присутствие в КК белка Y14, компонента ЕЈС. Его обнаружили с помощью АТ методами иммунофлуоресцентной и иммуноэлектронной микроскопии (Рис. 11). Результаты, полученные при обработке АТ, не дают динамической картины распределения белков ЕЈС. Для изучения их в динамике и выявления мест их накопления использовали микроинъекции в ооплазму мРНК слитого белка Y14-Мус (Johnson, 1983). Этот метод ранее успешно использовали в нашей лаборатории для детекции белков ядерной локализации в ооцитах насекомых (Боголюбов, 2003) и амфибий (Цветков и др., 2002).

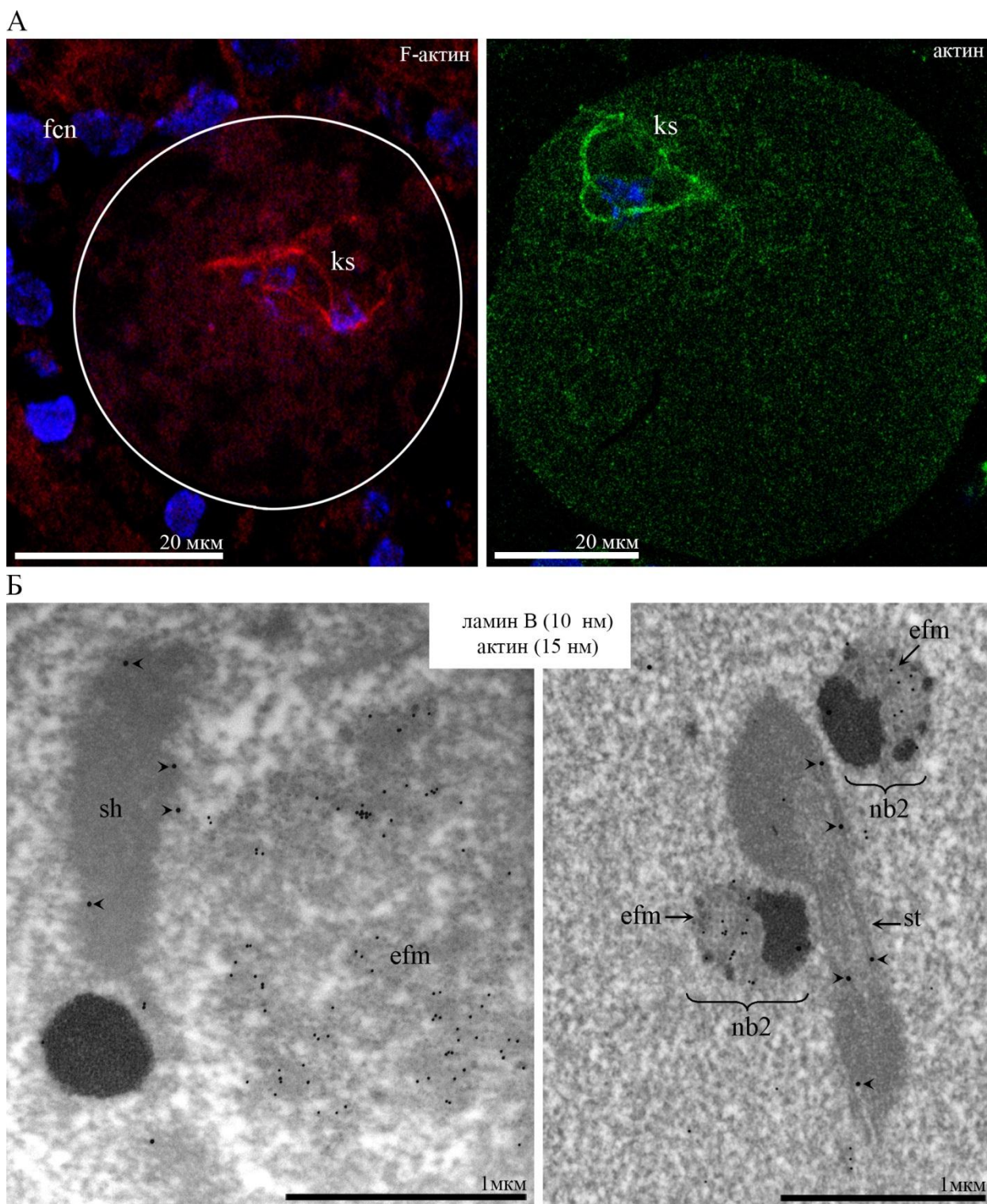


Рис. 9 Ядерный актин в ядрах ооцитов *T. castaneum*. **Панель А** — совмещённые конфокальные изображения изолированного ядра ооцита, ДНК окрашена То-Pro-3 (синий), ks — кариосфера с капсулой, **слева** — F-актин, окрашенный родамин-фаллоидином (красный), белой линией отмечена граница ядра, **справа** — актин окрашен антителами 1501R (зелёный). **Панель Б** — электронная микроскопия, ультратонкие срезы ядра ооцита *T. castaneum*, двойное мечение антителами к ламину В (10 нм) и актину (15 нм), отмечены стрелками. Актин локализован в материале капсулы кариосферы, ламин В ассоциирован с перекрученными филаментами (efm), **справа** — в области капсулы кариосферы, **слева** — в SC35-содержащих телах.

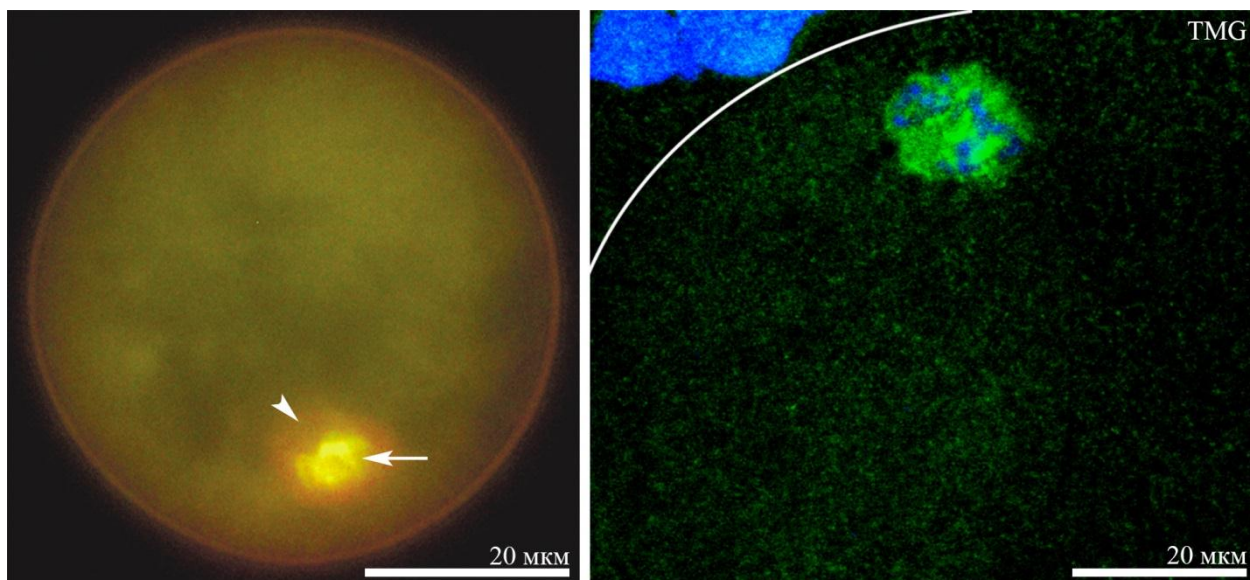


Рис. 10 Капсула кариосферы *T. castaneum*. Слева — ядро ооцита, обработанное акридиновым оранжевым, при такой обработке РНК окрашивается красным, а ДНК желтым. Справа — ядро ооцита *T. castaneum*, обработанное антителами к TMG (зелёный), ДНК докрашена DAPI (синий).

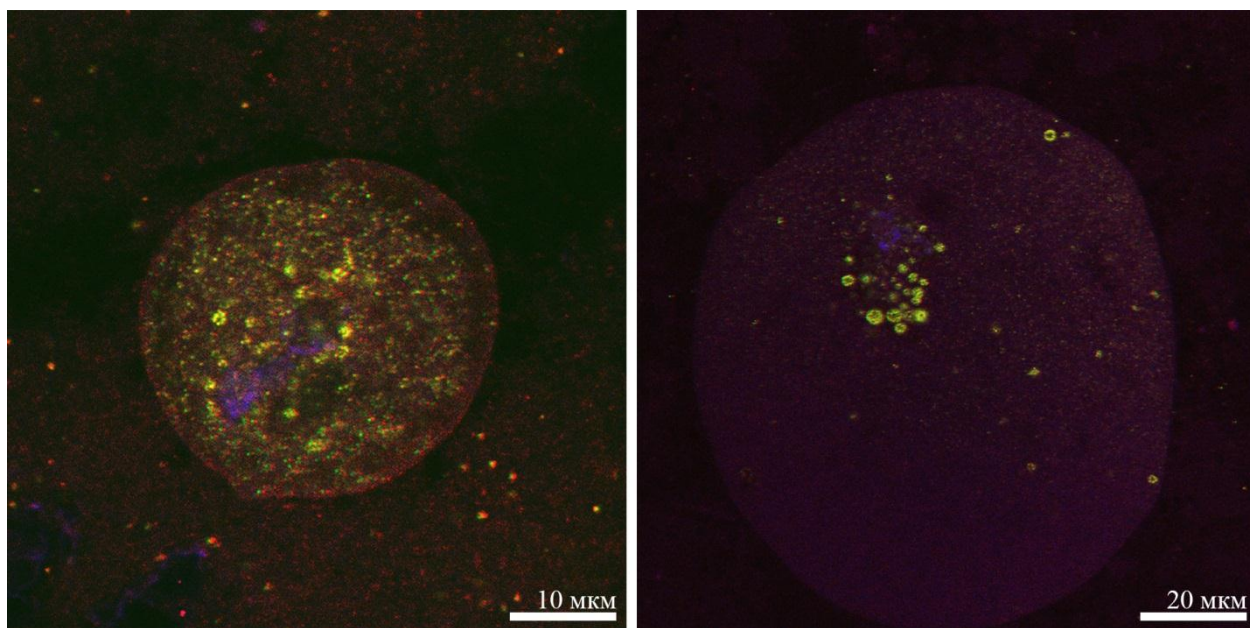


Рис. 11 Локализация белка Y14 в ядре ооцитов *T. castaneum*, SC35 (зелёный), Y14 (красный), ДНК докрашена DAPI (синий). Слева — ядро превителлогенного ооцита. Справа — ядро вителлогенного ооцита.

4.5 Конструкция слитого белка Y14-Мус

Фактор сплайсинга Y14, участвующий в процессе лигирования экзонов, который присутствует в КК (Рис. 11), стал основой конструкции для клонирования. Последовательность мРНК Y14 *T. castaneum* получили из базы данных NC (nucleotide collection) Национального центра биотехнологии и информатики (NCBI, США; шифр доступа: XM_962684.2). В качестве вектора выбрали коммерчески доступную плазмиду, несущую последовательность Мус-эпитопа. Мус-онкоген не экспрессируется у насекомых, и его нуклеотидная последовательность использована в качестве метки (tag) в конструкции. Кроме того, Мус-эпитоп минимально влияет на конформацию конечного слитого белка (Рис. 12).

Процесс получения конструкции состоял из следующих этапов (Рис. 12). мРНК выделяли из личинок *T. castaneum* (Рис. 13, А, I), затем на её основе синтезировали кДНК. Проводили ПЦР с полимеразой Pfu и геноспецифичными праймерами, подобранными к кодирующей последовательности Y14 *T. castaneum* (Рис. 12, В, Табл. 1). В результате получили ампликон без стоп-кодона, содержащий последовательности для рестрикции. Методом ТА-клонирования фрагмент вставили в вектор PTZ57R/T. После обработки соответствующими рестриктазами (Табл. 1) последовательность встраивали в вектор, содержащий открытую рамку считывания Мус-эпитопа (Рис. 12, А; Приложение 1). Далее последовательность переносили в вектор с промотором для транскрипции *in vitro*. С помощью ПЦР с праймерами, содержащими несколько изменённых по сравнению с канонической последовательностью нуклеотидов, в ПЦР продукт вносили стоп-кодон (Рис. 12, Б, Табл. 1, Приложение 2). На матрице очищенного фрагмента проводили ПЦР с полимеразой Pfu и праймерами M13. Получили ампликон, содержащий промотор T7, а на следующем этапе — кодирующую последовательность слитого белка Y14-Мус (Рис. 12, Г; Рис. 13, Б, II). Далее проводили транскрипцию *in vitro* мРНК слитого белка Y14-Мус с одновременным 5'-кэпированием (Рис. 12, Г; Рис. 13, А, II).

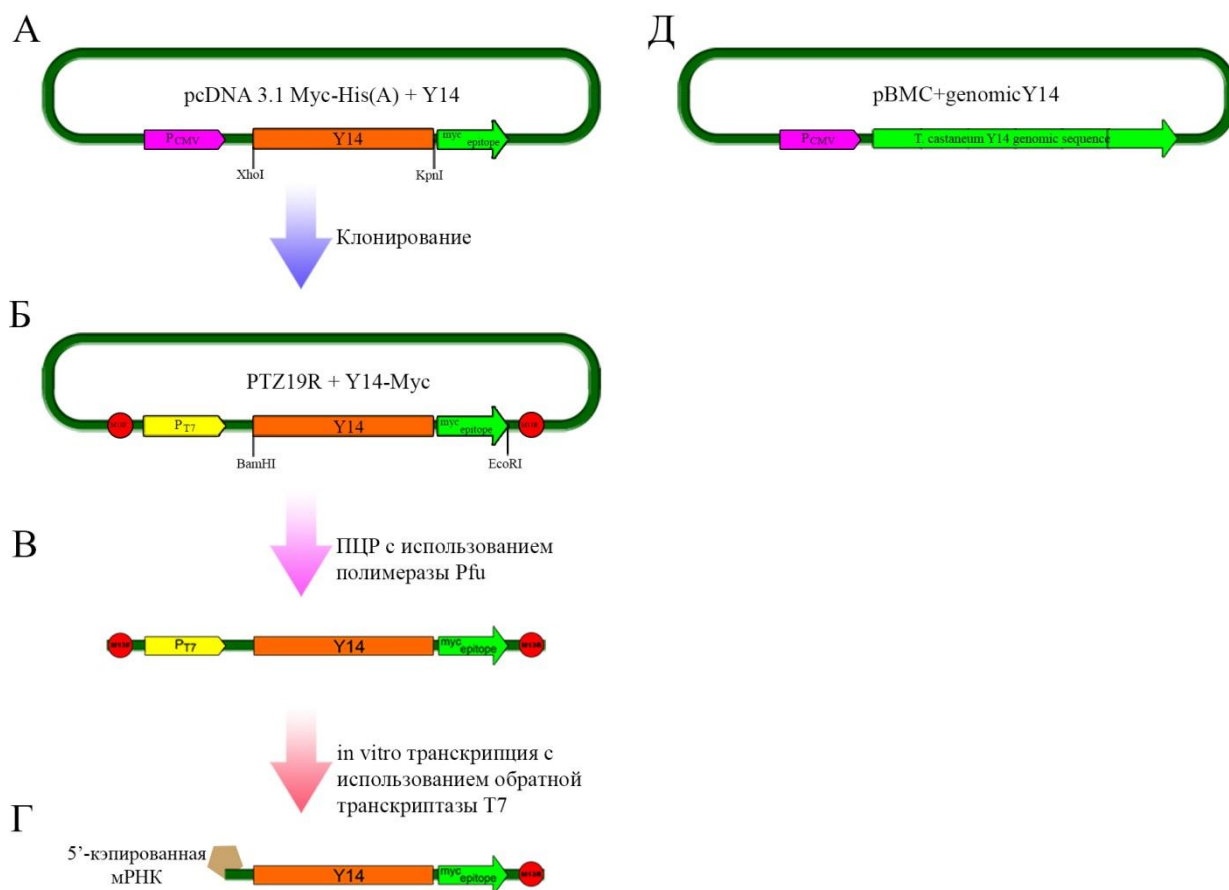


Рис. 12 Схема конструирования плазмид с мРНК Y14-Мус. **А** — кодирующая последовательность кДНК Y14 *T. castaneum* клонирована в вектор pcDNA3.1 Мус-Нис(А), **Б** — кодирующая последовательность Y14 *T. castaneum* с присоединённым к ней Мус-эпитопом клонирована в вектор PTZ19R, **В** — ПЦР с полимеразой Pfu для создания матрицы для транскрипции *in vitro*. **Г** — синтезированный *in vitro* транскрипт Y14 *T. castaneum*, содержащий Мус-эпитоп, **Д** — геномная, несплайсированная последовательность Y14 *T. castaneum* клонирована в вектор pBMC.

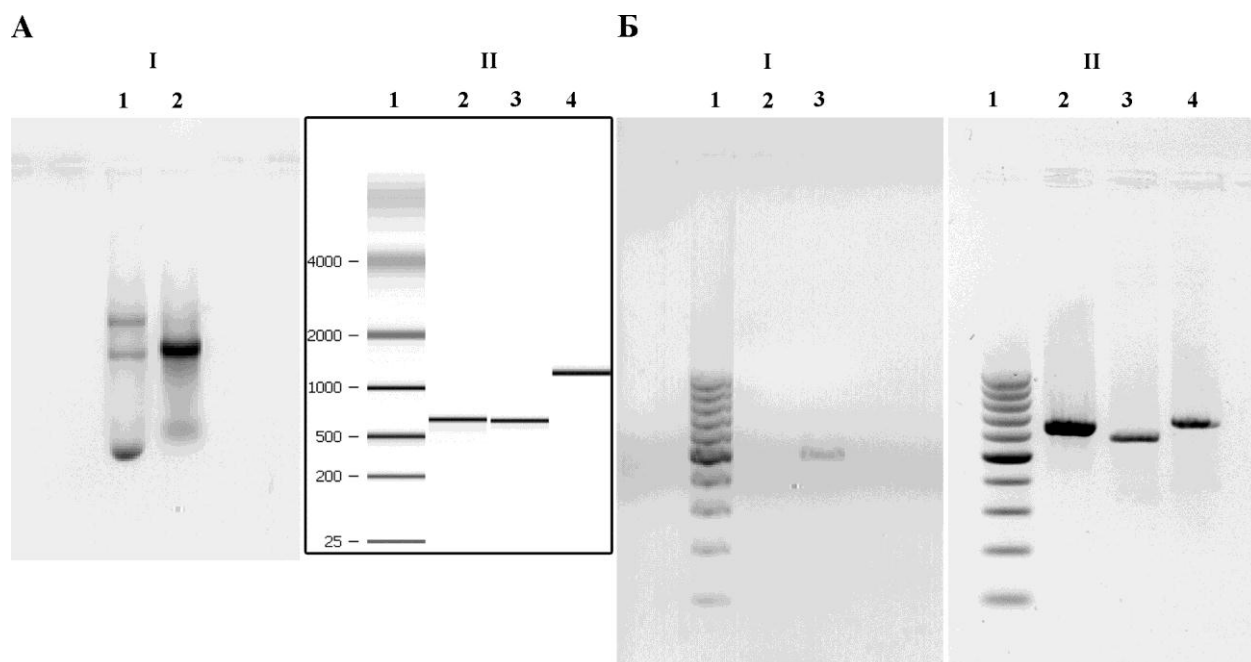
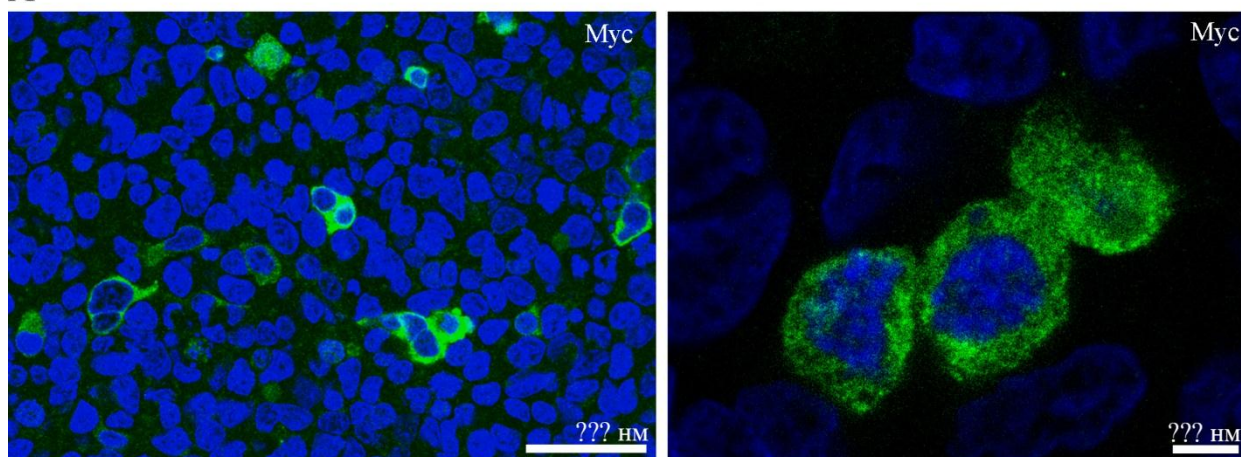


Рис. 13 Электрофоретический контроль этапов конструирования. **Панель А** — Электрофорез РНК. **I** — Электрофорез РНК в денатурирующих условиях: (1) тотальная РНК печени крысы (контроль); (2) тотальная РНК личинок *T. castaneum*. **II** — Транскрибированная *in vitro* РНК (электрофореграмма получена с использованием прибора Agilent 2100 Bioanalyzer): (1) — маркер (встроенная функция); (2, 3) — 5'-кэпированные *in vitro* РНК-транскрипты Y14-Мус (2 — 200 нг; 3 — 100 нг); (4) — мРНК GABDH, контроль (клетки человека линии HEK293, 200 нг). **Панель Б** — Электрофорез ДНК. **I** — Электрофорез после проведения реакции обратной транскрипции: (1) — маркер (100 п.н.); (2) — отрицательный контроль (ПЦР-смесь без добавления матрицы кДНК); (3) — ПЦР с тотальной кДНК *T. castaneum*, праймеры № 1, № 2 (номера праймеров в соответствии с Табл. 1) (506 п.н). **II** — Электрофорез после проведения реакции ПЦР с полимеразой Pfu, матрица для получения ампликона, с которого будет производиться транскрипция PTZ19R+Y14-Мус *in vitro*: (1) — маркер (100 п.н.); (2) — праймеры № 5, № 4; (3) — праймеры №3, № 6; (4) — праймеры № 5, № 6 (для проведения реакции обратной транскрипции) (639 п.н.)

А



Б

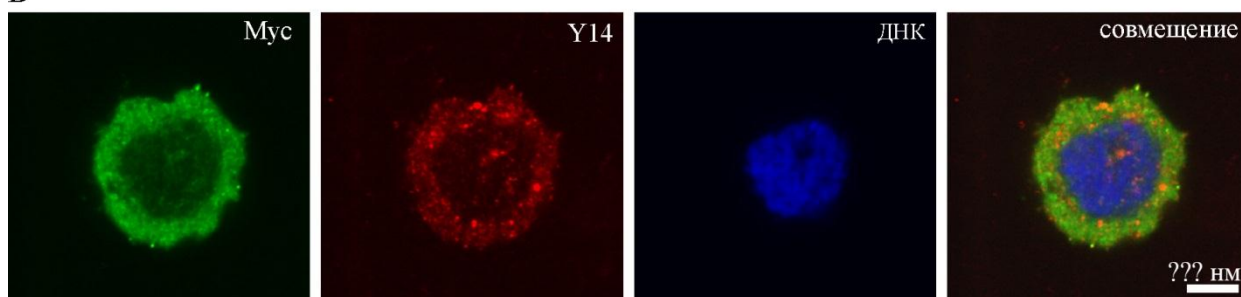


Рис. 14 Экспрессия плазмиды А (вектор Мус-His-А с последовательностью Y14) в клетках линии НЕК 293. Показаны микрофотографии культуры клеток (**Панель А**) под большим (**слева**) и малым (**справа**) увеличением. Клетки обработаны антителами к Мус-эпиту (зелёный), ДНК докрашена DAPI (синий). **Панель Б** — трансфецированная клетка, обработанная антителами к Мус-эпиту (зелёный) и Y14 (красный), ДНК докрашена DAPI (синий).

4.6 Транскрипция плазмиды и сплайсинг гена Y14 в клетках человека линии HEK293

Плазмида А (Рис. 12, Приложение 1) сконструирована не только для включения Мус-эпитопа в последовательность Y14, но и для проверки возможности экспрессии полученной конструкции в живых соматических клетках. Постоянная культура клеток *T. castaneum* недоступна. Гудман удалось добиться кратковременной стабилизации клеточной культуры *T. castaneum* (Goodman et al., 2012), но получить постоянную стабильную клеточную культуру *T. castaneum* пока не удалось. Поэтому для контроля экспрессии конструкции использовали клетки человека. Трансфекцию клеток HEK293 плазмидой А (Рис. 12, А, Приложение 1) проводили при помощи кальциевого метода, который обеспечивает умеренную эффективность трансфекции. Тем не менее ~10 % клеток успешно трансфецированы плазмидой А и экспрессировали конструкцию Y14-Мус. Слитый белок выявляли в основном в цитоплазме (Рис. 14). Выравнивание аминокислотных последовательностей Y14 *T. castaneum* и человека показало, что домены связывания РНК (RRM) весьма сходны, а сайты ядерной локализации (NLS) Y14 белков человека и жука имеют различия, которые, вероятно, не позволяют Y14-Мус *T. castaneum* проникнуть в ядро клеток человека (Рис. 15).

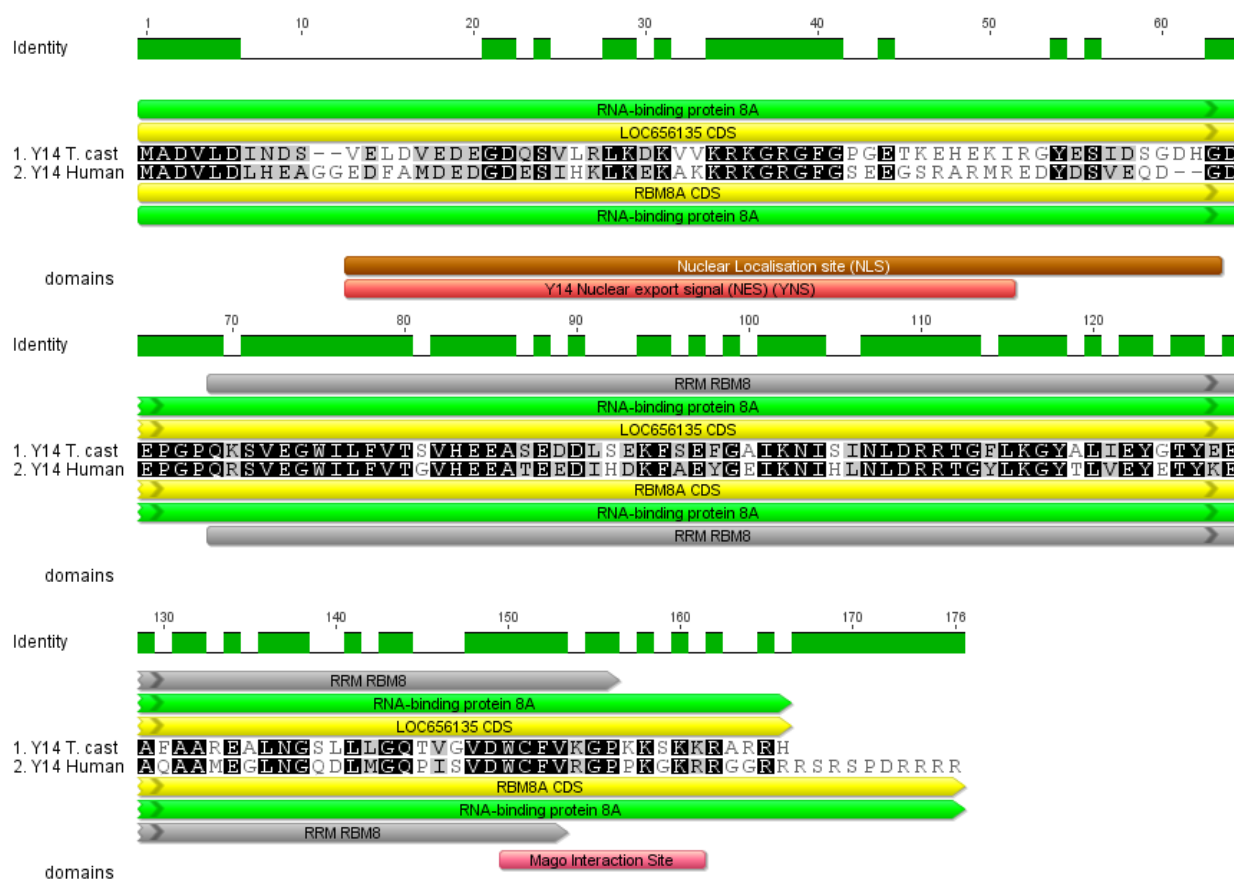


Рис. 15 Выравнивание белковых последовательностей 1. Y14 *T. castaneum* (XP_967777) и 2. *Homo sapiens* (NP_005096). Идентичные аминокислоты выделены чёрным, схожие — серым, белым выделены несхожие аминокислоты. Серой рамкой обозначен мотив связывания РНК RRM (RRM RBM8), зеленым — РНК-связывающий белок Y14 (RNA-binding protein 8A). Коричневой рамкой обозначен NLS (Nuclear localization site), Красной рамкой обозначен YNS (Y14 Nuclear export signal).

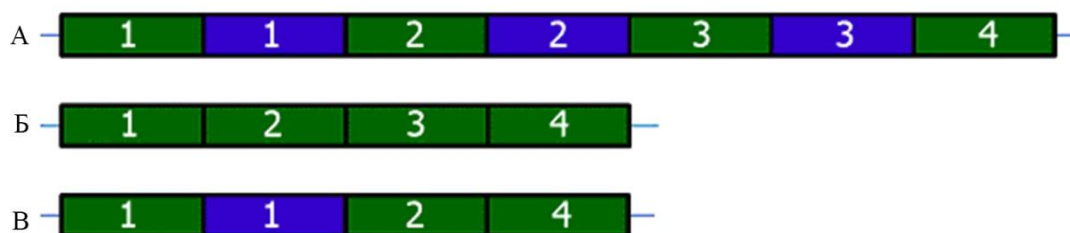


Рис. 16 Нормальный сплайсинг Y14 в клетках *T. castaneum* по сравнению с абортным в клетках человека HEK293. А — Геномная последовательность Y14, Б — нормальный сплайсинг Y14 *T. castaneum*, В — Неправильный сплайсинг Y14 *T. castaneum* в клетках HEK293 (человек). Зелёный — экзоны, синий — интроны.

Кодирующие последовательности белка Y14 человека и жука различаются не только NLS, но, вероятно, и сигналами сплайсинга. Нормальный сплайсинг пре-мРНК насекомых в клетках человека не происходит. Из геномной ДНК *T. castaneum* при помощи праймеров 001-DnaNheI-Forv и 002-DnaNot-Rev (Табл. 1), подобранных к геномной последовательности Y14 *T. castaneum* (шифр доступа NCBI: NW_001093646.1), амплифицировали несплайсированную последовательность Y14 (Рис. 16, А). После обработки рестриктазами (Табл. 1) фрагмент клонировали в вектор pBMC (Murashev et al., 2007), содержащий цитомегаловирусный промотор. Через 72 ч из культуры выделяли РНК, проводили обратную транскрипцию, амплифицировали фрагмент Y14 *T. castaneum* теми же праймерами (Табл. 1), клонировали и секвенировали амплифицированный фрагмент так, как описано в разделе «Материал и методика». Анализ последовательностей из 10 клонов показал, что все последовательности идентичны и отличаются от нормально сплайсированной мРНК Y14 (Рис. 16). Последовательность Y14 *T. castaneum*, процессирующаяся в клетках НЕК293 в ходе сплайсинга теряет интрон 2, экзон 3 и интрон 3, хотя экзон 4 остается (Рис. 16, С, Приложение 3). Таким образом, плаزمида успешно транскрибируется, но не процессируется в гетерологичной системе. Причины этого требуют специальных исследований с использованием культуры клеток *T. castaneum*, но abortивный сплайсинг объясняет отсутствие нормальной (ядерной) локализации слитого белка. В целях выявления локализации белка Y14 мы сконструировали плазмиду В (Рис. 12) для получения 5'-кэпированной мРНК и последующей ее микроинъекции в ооцит.

4.7 Инъекции мРНК Y14-Мус в ооцит

Микронъекции мРНК слитого белка в цитоплазму ооцита *T. castaneum* требуют длительного периода инкубации для трансляции и экспорта (3—7 ч), в этот период яйцевые трубки и ооциты должны оставаться живыми. Тестировали несколько видов сред, среди которых: RPMI-1640 (Moore et al., 1967), раствор Рингера (Hille, 1984), среда Grace (Grace, 1962) и среда ExCell 420 (Safcbioscience, США) (Goodman et al., 2012). Все среды использовали с добавлением 10 % FBS (Maranga et al., 2002). Препарирование насекомого и разделение яичника на отдельные овариолы проводили непосредственно в тестируемой среде. После препарирования овариолы переносили в свежую среду, каждые полчаса состояние яйцевых трубок и ооцитов контролировали под микроскопом. Лучший результат показала среда ExCell 420 (Safcbioscience, США) с добавлением 10 % FBS. В этой среде разделенные овариолы сохраняли морфологические характеристики и подвижность в течение 24 ч после препарирования, среда сохраняла исходную прозрачность и pH.

Кэпированную мРНК Y14-Мус инъецировали в ооплазму. Через 3—4 ч готовили давленные препараты ядер, на которых иммуноцитохимически выявляли Мус-эпитоп (tag). За время эксперимента мРНК транслировалась и продукт трансляции транспортировался в ядро, следовательно, отслеживали не весь Y14 ядра, а только недавно полученный экзогенный продукт. На стадии V оогенеза метка выявлена в SC35-доменах и КК; начиная со стадии VI оогенеза — только в КК (Рис. 18, Б). В перихроматиновой зоне кариосферы Y14-Мус колоколизировался с рыхлыми петлями ДНК, окружающими плотный клубок хромосом. КИГ-подобные тельца (SC35-содержащие домены) на стадии вителлогенеза, то есть начиная со стадии VI оогенеза, не содержали вновь синтезированный Y14 (Рис. 17, В). На поздних стадиях вителлогенеза скопления метки наблюдали в доменах, отличных от SC35-содержащих телец (Рис. 17, В, стрелки), и с внутренней стороны ядерной мембраны. Такая локализация слитого белка, вероятно, отражает транспорт вновь

синтезированного белка в ядро. Электронно-микроскопические наблюдения с использованием АТ к Мус-эпиту подтвердили присутствие слитого белка Y14-Мус в SC35-содержащих тельцах ооцитов стадии V оогенеза. На более поздних стадиях концентрация Y14-Мус в этих тельцах значительно уменьшается. По данным электронной микроскопии, в полностью сформированной КК метка Y14-Мус находится в фибриллярной зоне КК (Рис. 18, В).

На Рис. 17, В стрелками отмечены кластеры в нуклеоплазме, содержащие Y14-Мус. На Рис. 17, В представлен фрагмент капсулы кариосферы, скопления слитого белка (стрелки на Рис. 18, В). не имеют отношения к ЯТ какого-либо типа (сравн. Рис. 18, А и Б).

Таким образом, позиция вновь синтезированного Y14-Мус совпадает с местом остаточной транскрипции (см. выше) в пограничной (перихроматиновой) зоне кариосферы, расположенной между конденсированным хроматином и КК.

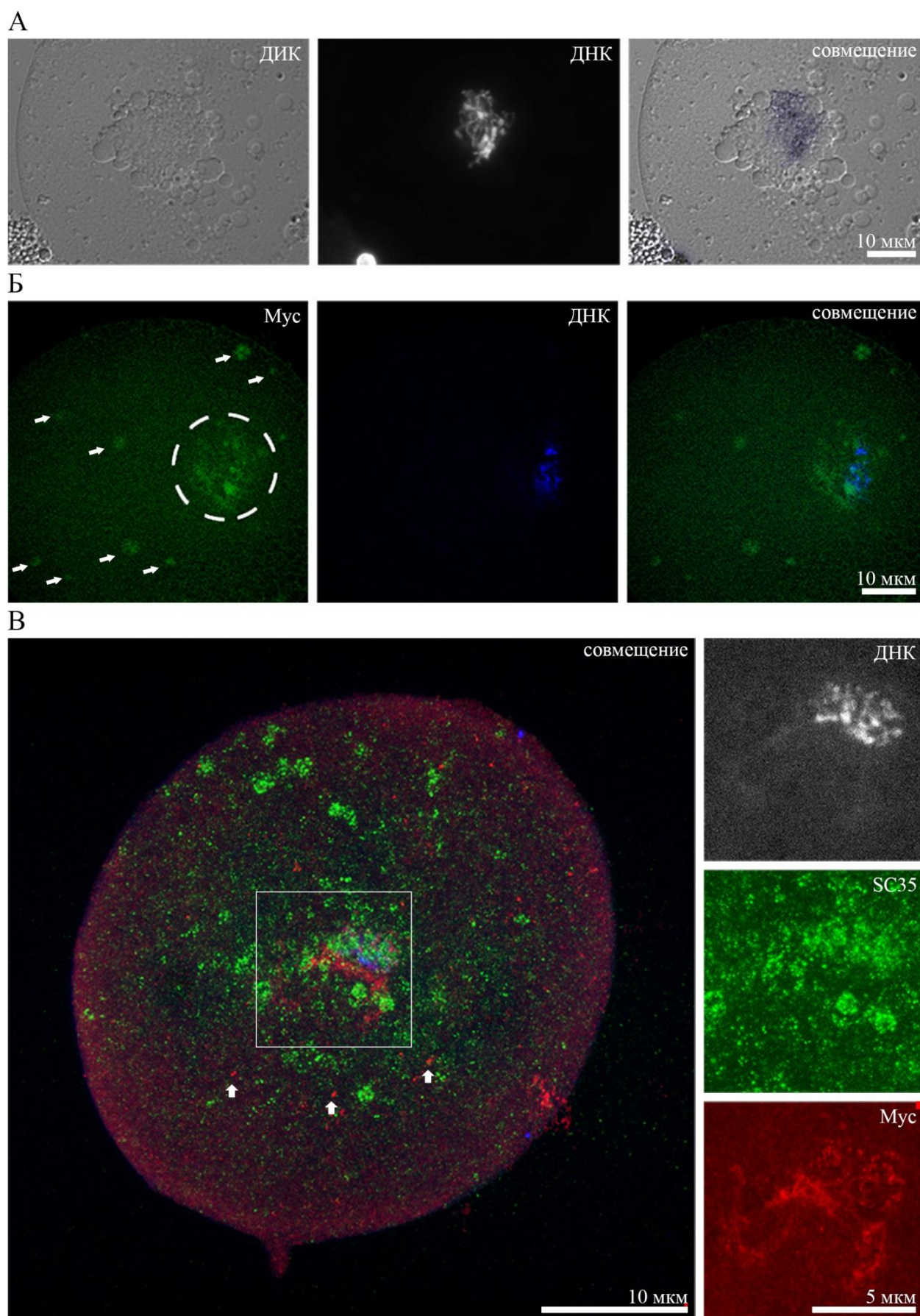


Рис. 17 Локализация слитого белка Y14-Мус в ядре ооцитов *T. castaneum*. **Панель А** — Изолированное ядро ооцита *T. castaneum* (дифференциальный интерференционный контраст, окрашивание DAPI); **Панель Б, В** — ядра после микроинъекций в ооплазму

мРНК Y14-Мус. На **панелях А и Б** представлен ооцит стадии V, на **панели В** — стадии VI. **Панели Б и В** — конфокальные изображения после обработки АТ к Мус-эпителию, SC35 или окрашивания ДНК с помощью DAPI или To-Pro-3 (указано на каждом изображении). На **панели Б** кариосфера с капсулой обведены пунктирной линией, SC35-содержащие домены отмечены стрелками. На **панели В** стрелками отмечены конгломераты слитого белка, не совпадающие с SC35-содержащими доменами. Область расположения кариосферы с капсулой выделена, изображения этой области в разных каналах приведены справа при большем увеличении.

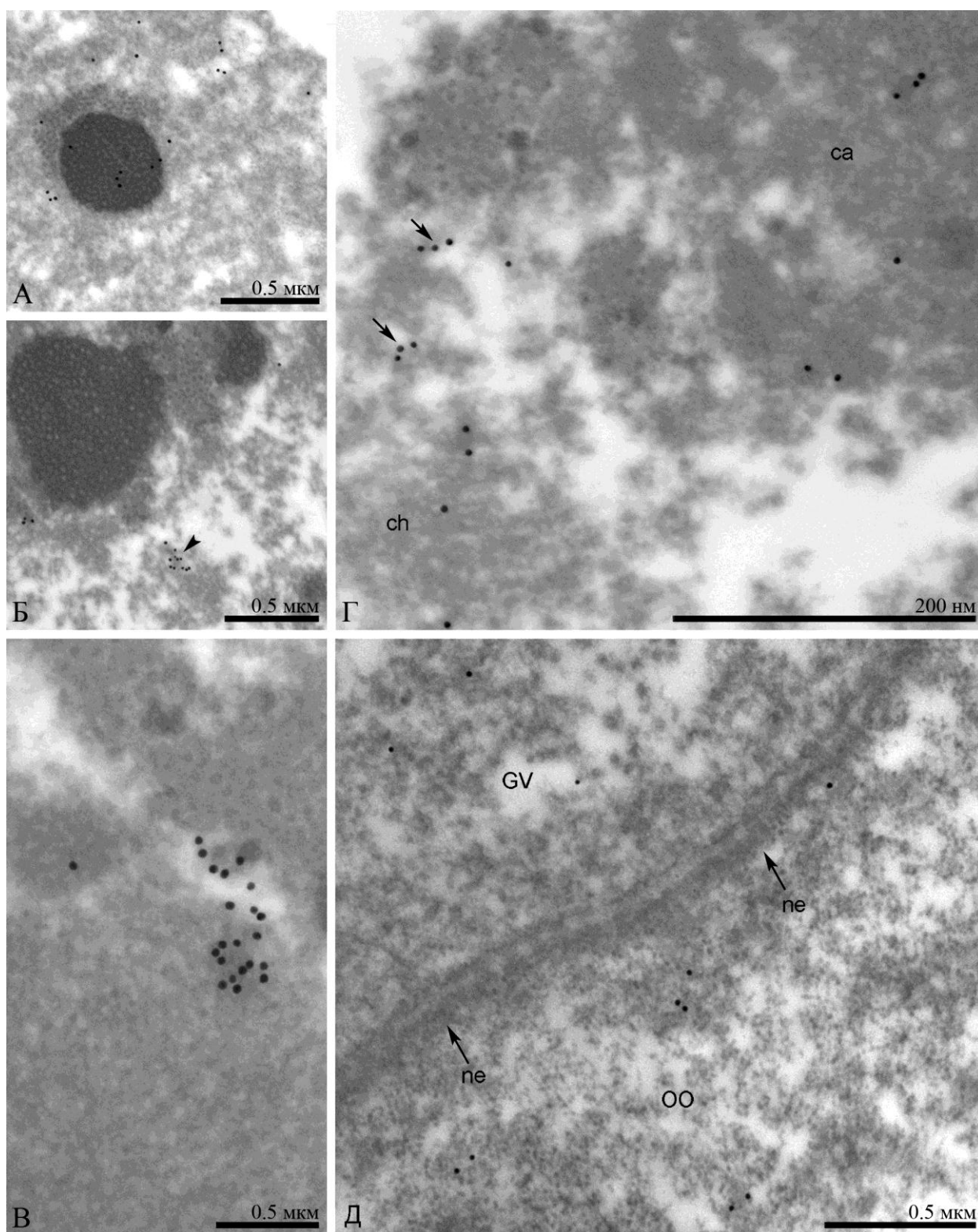


Рис. 18. Ультратонкие срезы ядер ооцитов *T. castaneum*, инъецированных мРНК Y14-Мус. Срезы обработаны антителами к Мус эпиту. SC35-домен на стадии V (А). SC35-домен на стадии VII (Б). Метка в зоне КК не совпадает с зоной расположения SC35-домена (В). Фрагмент кариосферы (ch — хроматин) и КК (ca): метка находится в перихроматиновом регионе (Г). Метка Y14-Мус в зоне ядерной мембраны (ne), GV — ядро ооцита, OO — ооплазма (Д).

5 Обсуждение

5.1 Трудности работы с объектом

Содержание жука *T. castaneum* в лабораторных условиях является тривиальной задачей в благоприятных условиях (свежая мука, температура 28 °С, влажность до 80 %), полный цикл размножения *T. castaneum* длится около 2 мес. Необходимо отметить, что в случае чрезмерного увеличения плотности популяции возможна дестабилизация и угнетение культуры с необратимыми последствиями; следовательно, культура нуждается в регулярном удалении части особей и смене субстрата.

Задача выполнения микроинъекции в ооциты *T. castaneum* сопряжена с рядом трудностей, связанных главным образом с небольшими размерами *T. castaneum*. Ранее в нашей лаборатории была разработана методика микроинъекции в ооциты жука *T. molitor* (Bogolyubov, 2007). Эта методика была успешно адаптирована для *T. castaneum*.

5.2 Структурные компоненты капсулы кариосферы и активная транскрипция

Формирование кариосферы, безусловно, сопровождается инактивацией и конденсацией хромосом, а вот биологическое значение формирования капсулы кариосферы (КК) неясно. Ранее предполагали, что образование КК коррелирует с неблагоприятными для откладки яиц условиями, как, например, у комаров (Fiil, 1976), или с физиологическими особенностями видов (Bogolyubov, Parfenov, 2008). Однако сходная физиология и жизненный цикл не говорит о наличии или отсутствии КК. Так, у жука *Tribolium* есть КК, а у сходного с ним по физиологии и жизненному циклу жука *Tenebrio* — нет. Несмотря на то, что функции КК до сих пор до конца неясны, она, безусловно, компартиментализует позднюю транскрипцию в ядре ооцита и, таким образом, полезна для понимания ключевых точек метаболизма РНК в ооците. Точно так же, стадия тотальной транскрипции в ооците, стадия

«ламповых щеток», во многом помогла понять сами закономерности транскрипции (Derjusheva et al., 2003; Saifitdinova et al., 2003).

Предположение о том, что КК является разновидностью ядерного матрикса, исходно выдвинуто на основании морфологических данных, полученных при помощи электронной микроскопии (Gruzova, Parfenov, 1993; Грузова и др., 1995). По методу выделения ядерный матрикс (ЯМ) определяют как сеть филаментов, устойчивую по отношению к детергентам и растворителям с высокой ионной силой (Збарский, Дебов, 1948; Berezney, Coffey, 1974; Malyavantham et al., 2008). Многолетняя дискуссия и большое количество исследований, выполненных в рамках концепции ЯМ, не прояснили до конца, существует ли в ядре эукариотической клетки сеть гетерогенных или гомогенных филаментов *in situ* (Hancock, 2000; Pederson, 2000). Появившаяся позднее концепция хромосомных территорий (ХТ) предполагает существование компонентов ЯМ как в интерхроматиновом пространстве в составе ядерных доменов (телец), так и внутри ХТ в качестве белков скаффолда хромосом (Zorn et al., 1976).

Существование *in situ* и *in vivo* одного из компонентов ЯМ — ламины (Peric-Hupkes D., van Steensel B. 2010.), состоящей из белков класса промежуточных филаментов, не вызывает сомнений (Broers et al., 1999; Stuurman et al., 1998).

Ламин В присутствует в протяжённых филаментах КК. Ламины — белки класса промежуточных филаментов — критически важны для структуры ядра (Dechat et al., 2010). На основании структурных, биохимических и динамических характеристик ламины делят на классы А/С и В. У большинства беспозвоночных присутствует только один ген, кодирующий ламин типа В (Melcer et al., 2007). В последние годы ламин-хроматиновое взаимодействие активно изучали. В результате появилось представление о ламин-ассоциированных доменах (ЛАД, LAD), которые несут маркеры репрессированного хроматина (Guelen et al., 2008; Pickersgill et al., 2006). ЛАД относительно бедны генами, а те немногие, что

присутствуют — молчат как в клетках человека, так и дрозофилы. При дифференцировке эмбриональных стволовых клеток мыши (ESC) общий паттерн ЛАД в геноме остается стабильным. В инактивированном хроматине ядра ооцита возможны функциональные ассоциации с ламином, но при этом ламин безусловно находится в составе КК.

В составе ЯМ находят белки, участвующие в транскрипции, сплайсинге РНК и репликации ДНК. Полагают, что ЯМ играет фундаментальную роль в организации этих процессов (Malyavantham et al., 2008). Но даже если ЯМ как сеть опорных филаментов не является необходимой структурой для ядра соматической клетки, то в ядре ооцита такая сеть филаментов присутствует.

Кроме ламинов структурным компонентом филаментов ядра ооцита является актин. С помощью мечения тяжелым меромиозином удалось проследить периодичность по длине ядерного актинового филамента (Дроздов, Парфёнов, 1983; Парфёнов, Галактионов, 1987). С помощью электронной микроскопии с полевой эмиссией (feSEM) и методики максимально щадящей пробоподготовки в ооцитах *Xenopus* показано наличие внутриядерной сети филаментов, соединенных с поровыми комплексами (Kiseleva et al., 2004). «Нити, связанные с порами» (pore-linked filaments, PLFs) внедряются в экстрахромосомные ядерные домены — сферические структуры размером от 100 нм до 5 мкм в диаметре, некоторые из которых определены как тельца Кахала (ТК). Полимеризация актина необходима для стабилизации специфической пространственной организации ядерных структур растущих ооцитов птиц и амфибий. В экспериментах с агентами, деполимеризующими актин (цитохалазин Д и латрункулин А), показано, что разборка полимерного ядерного актина ведет к конденсации хромосом и их перемещению в ограниченное пространство внутри ядра ооцита (Maslova, Krasikova, 2012).

В КК *T. castaneum* актин в основном найден в филаментной форме в оболочке капсулы. F-актин определили как основной компонент КК долгоносиков (Świątek, 1999), сетчатокрылых (Rübsam, Büning, 2001), и,

кроме насекомых, лягушки (Parfenov et al., 1995). В составе КК полимеризованный актин (F-actin) играет существенную структурную роль. У организмов, у которых ядро ооцита не содержит КК, нашли актин в мономерной (олигомерной) форме, и он играет роль в формировании кариосферы (Djagaeva et al., 2005). Мутации в генах, кодирующих актин-связывающие белки, заметно нарушают процесс схождения хромосом в кариосферу у дрозофилы (Djagaeva et al., 2005).

Известна роль актина в процессе транскрипции (Grosse, Vartiainen, 2013; Kukalev et al., 2005). Обнаруженная в нашей работе транскрипция в перихроматиновом пространстве КК предполагает участие в ней актина и, возможно, не только в F-форме.

В настоящей работе мы показали, что актин и ламин В входят в состав элементов КК ооцитов насекомого *T. castaneum*. Небольшие локальные сети филаментов (gene expression matrices) могут присутствовать в местах активной транскрипции в соматических клетках (Pederson, 2000). Можно ожидать их присутствие и в ядре ооцитов. Ядро ооцита *T. castaneum* оказалось удобным объектом: на стадиях V–VI оогенеза морфологически чётко определяется участок остаточной транскрипции — перихроматиновая зона кариосферы, представляющая собой пограничную область между конденсированным хроматином и КК.

Активная транскрипция в интерхроматиновом пространстве предполагает и присутствие в КК различных факторов, обслуживающих этот процесс. Действительно, антитела против Sm-эпитопа мяРНП интенсивно окрашивают материал оболочки КК, что свидетельствует о присутствии в ней комплексов, участвующих в сплайсинге (Bogolyubov et al., 2013). Чтобы убедиться, что мяРНП действительно присутствуют в КК, мы использовали мышиные антитела K121 против TMG-кэпа мяРНП. Они также дают сильную окраску в оболочке КК (Рис. 10). Иммуноэлектронная микроскопия (ИЭМ) позволила найти мяРНП не только в КК, но также в тельцах 1-го типа и в нуклеоплазме. В других тельцах (2-го и 3-го типов) с помощью ИЭМ при

использовании этих АТ TMG-кэп не обнаружен. Ранее мы сообщали о присутствии мяРНП в КК *T. castaneum* (Боголюбов и др., 2012а), теперь мы можем утверждать, что в их составе находится TMG-кэпированная мяРНК. Это подтверждено ИЭМ, метку K121 против TMG-кэпа мяРНП наблюдали и в КК. TMG-кэпирование происходит в цитоплазме в результате гиперметилирования монометильного гуанозинового кэпа на 5'-конце молекулы мяРНК перед тем, как мяРНП комплексы импортируются назад в ядро (Will, Lührmann, 2001; Patel, Bellini, 2008). Сходные результаты получены и на другом жуке, *Anthonomus pomorum* (Świątek, Jaglarz, 2004), где мяРНП выявлены в КК, а не в ядерных тельцах.

Общепринятым является мнение о том, что кариосфера формируется как итог инактивации хромосом (Gruzova, Parfenov, 1993). Мы проверили это положение для ооцита *T. castaneum*. Мы инъецировали BrUTP на разных стадиях развития ооцита. Сигнал включения BrUTP регистрируется в кариосфере на всех стадиях ее формирования. Удивительно, что отчетливое включение есть даже на поздних стадиях вителлогенеза (стадии VII—VIII оогенеза, Рис. 18). Иммуноцитохимическое окрашивание препаратов ядер ооцитов на поздних стадиях оогенеза при помощи АТ против гиперфосфорилированной (удлиняющей) РНК-полимеразы II показало присутствие этой формы в КК, видимо, в перихроматиновом районе. Использование АТ против транскрипционных факторов TBP (ТАТА-связывающая субъединица TFIID) и TFIIN на электронно-микроскопическом уровне показало их присутствие именно в перихроматиновом пространстве КК. АТ против ДНК использовали, чтобы подтвердить присутствие деконденсированных петель ДНК в перихроматиновом пространстве (Рис. 7). Поли(А)⁺-РНК также присутствует в КК на поздних стадиях развития ооцита (см. ниже).

Присутствие РНК согласуется с представлением о том, что КК является своеобразной модификацией ядерного матрикса (Gruzova, 1988; Gruzova, Parfenov, 1993). Остаточная транскрипция в перихроматиновом пространстве

КК жука *T. castaneum* документирована в предыдущих (Боголюбов и др., 2012а; Bogolyubov et al., 2013) и в настоящей работе.

5.3 Динамика ядра ооцита

В соматических клетках экстрахромосомные ядерные домены — динамичные структуры с изменяющимся составом. Они являются транзитными доменами для ряда факторов экспрессии генов. Например, несмотря на локальную концентрацию в КИГ факторов сплайсинга, которая в 5–10 раз превышает таковую в окружающей нуклеоплазме (Wei et al., 1999), большинство белков КИГ характеризуется высокой динамикой, задерживаясь в КИГ не дольше, чем в других участках ядра (Phair, Misteli, 2000).

Белок Y14 является компонентом КИГ на определенных стадиях развития ооцита (V—VI, Рис. 18). Показано, что 2'-O-метил(U)₂₂-олигорибонуклеотидный зонд выявляет поли(A)⁺-РНК с высокой эффективностью (Majlessi et al., 1998; Molenaar et al., 2001). Мы инъецировали такой зонд в ооциты *T. castaneum* и обнаружили, что большинство КИГ (SC35-доменов) ядер ооцитов содержат поли(A)⁺-РНК. Аналогичные результаты получили на ооцитах жука *T. molitor* (Боголюбов и др., 2012а, 2012б), скорпионницы *P. communis* (Batalova et al., 2010). Поли(A)⁺-РНК с помощью той же метки обнаружили и в КИГ (SC35-доменах) эмбрионов мыши на 2-клеточной стадии развития (Bogolyubova et al., 2009). Однако на поздних стадиях оогенеза большая часть поли(A)⁺-РНК обнаруживается в КК (Bogolyubov et al., 2013).

На материале ядер соматических клеток млекопитающих установили, что популяция поли(A)⁺-РНК в КИГ мобильна, и при этом осуществляется постоянный, не требующий затрат энергии, обмен её молекулами между КИГ и окружающей нуклеоплазмой (Ishihama et al., 2008; Molenaar et al., 2004; Politz et al., 2006). Динамичная ассоциация поли(A)⁺-РНК и КИГ при этом сохраняется и в транскрипционно инактивированных клетках; следовательно, её можно ожидать и в ооците.

Природа полиаденилированной РНК в КИГ и её роль остаётся спорной. Выдвинуто несколько гипотез относительно роли КИГ в метаболизме поли(А)⁺-РНК. Во-первых, КИГ может быть связана деградация аномальных (бессмысленных) молекул поли(А)⁺-РНК (Puvion, Puvion-Dutilleul, 1996). Во-вторых, часть поли(А)⁺-РНК в КИГ, возможно, состоит из некодирующих последовательностей, представляющих собой большие некодирующие (large noncoding) полиаденилированные РНК, которые принимают участие в контроле экспрессии генов и метаболизме мРНК (Morey, Avner, 2004). Так, в КИГ соматических клеток человека и мыши идентифицированы две группы таких РНК, относящихся к классу NEAT (nuclear enriched abundant transcripts): NEAT1 и NEAT2/MALAT-1 (Hutchinson et al., 2007). Идея о прямой роли КИГ в метаболизме мРНК (Hall et al., 2006; Molenaar et al., 2004) предполагает, что по крайней мере часть обнаруживаемой в КИГ поли(А)⁺-РНК представляет собой мРНК или пре-мРНК.

При количественном анализе с использованием техники FRAP показано, что абсолютное большинство (почти 75 %) ядерной поли(А)⁺-РНК проходит через КИГ (Molenaar et al., 2004). Это предполагает прямое участие КИГ в контроле корректного сплайсинга и приобретении мРНК компетентности к экспорту (Johnson et al., 2000). Динамичность КИГ подтверждается тем, что большинство белков имеет высокую скорость обмена между нуклеоплазмой и КИГ, а срок пребывания в КИГ в среднем составляет 1 мин или меньше (Kruhlak et al., 2000).

Метод бимолекулярной флуоресцентной комплементации позволяет исследовать молекулярные взаимодействия *in vivo*. С помощью этого метода получены интригующие данные по накоплению в КИГ функционально связанных между собой факторов экспорта мРНК: NXF1 и Y14 (Schmidt et al., 2006).

Генно-инженерный подход с микроинъекциями синтезированных *in vitro* мРНК-конструкций даёт возможность проследить за динамикой перемещения в клетке вновь синтезированного белка. В качестве мишени слежения мы

выбрали белок, активно участвующий в процессинге пре-мРНК и опосредованно в транспорте мРНК (Киселёв, 2014). В соматических клетках экспорт мРНК направляется эволюционно консервативным белковым комплексом TREX, который располагается ближе к 5'-концу пре-мРНК (Cheng et al., 2006). Еще одним важным комплексом, участвующим в экспорте мРНК, является комплекс соединения экзонов EJC, который имеет несколько общих белков с TREX (Aly/REF и UAP56). EJC связывается с пре-мРНК во время сплайсинга и локализуется на 20—24 нуклеотидов выше точки соединения экзонов. EJC необходим для рекрутирования на зрелую мРНК факторов экспорта. EJC экспортируется в цитоплазму вместе с мРНК (Le Hir et al., 2001a). Этот комплекс участвует в деградации мРНК (nonsense-mediated decay), если хотя бы один EJC располагается ниже стоп-кодона (Schoenberg, Maquat, 2012). EJC состоит из двух групп белков. Первая группа составляет ядро (core) этого комплекса, а вторая — его оболочку (shell). Одним из хорошо описанных коровых компонентов EJC является гетеродимер Y14/Magoh, который ассоциирует с пре-мРНК на этапе лигирования экзонов (Jurica, Moore, 2003; Reichert et al., 2002).

Опыты по трансфекции клеточной культуры НЕК293 плазмидой, которая включает кодирующие последовательности Y14 *T. castaneum* и Мус, показали (Киселёв, 2014), что описанная конструкция успешно транскрибируется в клетках человека, но её сплайсинг в гетерологичной системе проходит некорректно (Приложение 3). Причины abortивного сплайсинга должны стать предметом отдельного исследования. Инъецированная в ооплазму *T. castaneum* мРНК слитого белка Y14–Мус за 3 ч успешно транслировалась, продукт трансляции импортировался в ядро ооцита. Это свидетельствует о корректном прохождении сплайсинга. Высокий уровень флуоресцентного сигнала наблюдался в перихроматиновых участках кариосферы, в области расположения слабо конденсированных петель ДНК (Рис. 17). Электронная микроскопия показывает, что метка

находится на границе между собственно кариосферой (хроматин) и КК (Рис. 18).

Опыты со слитым белком показали, что белок Y14 по-разному локализован на разных стадиях развития ооцита. Если на стадиях IV–V оогенеза, в начале формирования КК, белок Y14 выявляется в SC35-содержащих доменах (Рис. 18, А), то на поздних стадиях оогенеза он перемещается в сформированную КК (Рис. 18, Б). Можно предположить, что так же, как и в соматических клетках (Spector, Lamond, 2011), SC35-содержащие тельца ядра ооцитов *T. castaneum* представляют собой транзитные домены для некоторых белков, которые связаны с транспортом и экспортом мРНК.

Возможно, в составе ядерных телец есть и другие белки, которые входят в состав КК на терминальных стадиях развития ооцита. При выявлении различных ядерных белков методом иммунофлуоресценции (Табл. 2) обнаружили, что некоторые из них, так же как и Y14, могут менять места локализации в зависимости от стадии развития ооцита. Так, например, белки гЯРНП A1, Aly, NXF1 на превителлогенной стадии находятся в КИГ, а на вителлогенной меняют свою локализацию и обнаруживаются преимущественно в КК.

Для биологии развития принципиально важен вопрос о том, какая РНК последней транскрибируется в ооците с инактивированным геномом при подготовке к оплодотворению. Организмы с развитой КК могут быть удобным объектом для решения этого вопроса. Окрашивание ядер ооцитов для выявления тотальной РНК показало, что в них на поздних стадиях вителлогенеза присутствует значительное количество РНК. Основная масса этой РНК сконцентрирована в области КК.

Транскрипция в процессе оогенеза очень активна; на стадии ламповых щёток транскрибируются «молчащие» в соматических клетках участки генома (Gilbert, 2000; Hourcade et al., 1973). Закрепление в ооплазме мРНК, кодирующих белки материнского эффекта, хорошо документировано и имеет

существенное значение для развития. Например, мРНК белка материнского эффекта Oscar детерминирует первичные оси в неоплодотворенном яйце, а белки Y14 и Magoh отвечают за закрепление мРНК Oscar на полюсе ооцита (Mohr et al., 2001). Однако данные о распределении различных мРНК в ядре ооцита в литературе практически не встречаются (Edström, 1960). Можно предположить, что мРНК, накапливающиеся в КК, и особенно те РНК, которые синтезируются в оогенезе последними, принципиально важны для будущей организации развивающегося эмбриона. Присутствие РНК в КК служит еще одним подтверждением того, что КК является модификацией ЯМ, поскольку в ЯМ соматических клеток *in vivo* присутствуют РНП — набор белков в комплексе с РНК (Podgornaya et al., 2003).

В последнее время появляется всё больше работ о ключевой роли РНК в эмбриональном развитии (Fadloun et al., 2013; Probst et al., 2010). Морфологические и гистохимические методы не дают информации о природе этой РНК. Уже появились современные способы определить природу РНК ядра ооцита, а возможно, и РНК в составе КК. Так, состав РНК сперматозоидов мыши оказался принципиально отличным от такового гонад, и выявлены специфичные для спермиев РНК (spR), участвующие в раннем эмбриогенезе (Kawano et al., 2012). Основным условием идентификации РНК является наличие прочитанного генома организма. *T. castaneum* удовлетворяет этому условию. Остаточная транскрипция, прослеженная в настоящей работе на поздних стадиях оогенеза *T. castaneum*, позволяет надеяться на определение в дальнейшем природы РНК, синтезирующейся последней в оогенезе.

6 Выводы

1. В ядре ооцитов *T. castaneum* формируется кариосфера, окружённая развитой экстрахромосомной капсулой. В перихроматиновых участках кариосферы сохраняется остаточная транскрипция вплоть до конца периода роста ооцита.
2. В нуклеоплазме присутствует 3 типа ядерных телец: коилинсодержащие (аналоги телец Кахала), SC35-содержащие (аналоги кластеров интерхроматиновых гранул) и крупные фибриллярные тельца неизвестной природы. SC35-содержащие домены содержат поли(A)⁺-РНК, белок A1 hnРНК, компоненты комплекса соединения экзонов (EJC), но не содержат ТМГ-кэпированные малые ядерные РНК (snРНК), характерные для типичных КИГ.
3. Фибриллярный компонент капсулы кариосферы содержит F-актин и ламин В.
4. Капсула кариосферы содержит основную массу РНК ядра; среди этих РНК есть мяРНК и поли(A)⁺-РНК.
5. Синтезированная *in vitro* мРНК слитого белка Y14-Мус успешно экспрессируется как в клетках человека модельной линии НЕК293, так и в инъектированных ооцитах *T. castaneum*.
6. Капсула кариосферы содержит фактор сплайсинга Y14 — коровый белок EJC. SC35-содержащие тельца являются транзитными экстрахромосомными доменами для белка Y14, а капсула кариосферы — его дефинитивным компартментом.

7 Список литературы

1. *Александрова О.А.* 1992. Внутриядерные тельца и формирование капсулы кариосферы в ооцитах жука-чернотелки *Tentyria noma taurica*. Цитология. 34: 30—37.
2. *Баталова Ф.М., Боголюбов Д.С.* 2013. Капсула кариосферы в ооцитах *Tribolium castaneum*. Цитология. 55: 796—806.
3. *Баталова Ф.М., Степанова И.С., Боголюбов Д.С.* 2000. Ядрышки и перенуклеоллярные тельца в трофоцитах *Ranatra communis* содержит факторы сплайсинга пре-мРНК. Цитология. 42: 624—634.
4. *Боголюбов Д.С.* 2003. Тельца Кахала в ооцитах насекомых. I. Идентификация и иммуноцитохимическая характеристика телец Кахала в вителлогенных ооцитах жука-чернотелки. Цитология. 45: 1083—1093.
5. *Боголюбов Д.С., Александрова О.А., Цветков А.Г.* 1997. Ядро ооцитов жука-чернотелки *Tenebrio molitor*. (электронно-микроскопическое, цитохимическое и автордиографическое исследование). Цитология. 39: 643—650.
6. *Боголюбов Д.С., Баталова Ф.М., Киселёв А.М., Парфёнов В.Н.* 2012a. Распределение 5'-триметилгуанозин-кэпированных малых ядерных РНК в экстрахромосомных ядерных структурах ооцитов лабораторного насекомого *Tribolium castaneum*. Докл. АН. 444 (6): 691—694.
7. *Боголюбов Д.С., Киселёв А.М., Шабельников С.В., Парфёнов В.Н.* 2012b. Полиаденилированные РНК и факторы экспорта мРНК в связи с экстрахромосомными ядерными доменами вителлогенных ооцитов насекомого *Tenebrio molitor*. Цитология. 54 (6): 497—507.
8. *Гагинская Е.Р.* 1975. О классификации типов оогенеза. Онтогенез. 6: 539—545.
9. *Грузова М.Н.* 1960. Образование кариосферы в оогенезе сетчатокрылых насекомых рода *Chrysopa*. Цитология. 2 (5): 519—527.
10. *Грузова М.Н.* 1977. Ядро в оогенезе (структурно-функциональный аспект). В кн.: Современные проблемы оогенеза. М., Наука, 51—98.
11. *Грузова М.Н., Баталова Ф.М.* 1979. Ядерные структуры в телотрофных овариолах жуков-чернотелок (Tenebrionidae, Polyphage). II. Ядро ооцитов *Blaps lethifera* и *Gnaptor spinimanus*. Онтогенез. 10: 323—332.
12. *Грузова М.Н., Зайчикова З.П.* 1968. Ультраструктура кариосферы в ооцитах золотоглазки. Цитология. 10: 1180—1182.

13. Грузова М.Н., Зайчикова З.П. 1972. Структурная и функциональная организация ядра ооцитов золотозлазки (отр. сетчатокрылых). I. Нуклеоллярный аппарат и экстрахромосомная ДНК. Цитология. 14: 269—276.
14. Грузова М.Н., Цветков А.Г., Почукалина Г.Н., Парфёнов В.Н. 1995. Формирование кариосферы в оогенезе некоторых насекомых и амфибий. Цитология. 37 (8): 744—769.
15. Дроздов А.Л., Парфёнов В.Н. 1983. Актиновые филаменты в ядрах ооцитов травяной лягушки. Докл. АН СССР. 273 (5): 1237—1240.
16. Збарский И.Б., Дебов С.С. 1948. Белки клеточного ядра. Докл. АН СССР. 62 (6): 795—798.
17. Киселёв А.М. 2014. Использование искусственных слитых белков для исследования ядерных структур ооцитов жука *Tribolium castaneum*. VII международная научно-практическая конференция «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», Санкт-Петербург.
18. Парфёнов В.Н., Галактионов К.И. 1987. Внутрядерные актиновые микрофиламенты в ооцитах травяной лягушки. Цитология. 29 (2): 142—149.
19. Равен Х. 1964. Оогенез. Накопление морфологической информации. М.: Мир. 306 с.
20. Цветков А.Г., Сковородкин И.А., Боголюбов Д.С., Квасов И.Д., Парфёнов В.Н. 2002. Экстрахромосомные структуры, содержащие малые ядерные РНП и коилин, в ядрах поздних вителлогенных ооцитов зимующих травяных лягушек. Цитология. 44 (11): 1037—1045.
21. Anders K.R., Grimson A., Anderson P. 2003. SMG-5, required for *C.elegans* nonsense-mediated mRNA decay, associates with SMG-2 and protein phosphatase 2A. EMBO J. 22: 641—650.
22. Baker K.E., Parker R. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. Curr. Opin. Cell Biol. 16: 293—299.
23. Ballut L., Marchadier B., Baguet A., Tomasetto C., Séraphin B., Le Hir H. 2005. The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. Nat. Struct. Mol. Biol. 12: 861—869.
24. Batalova F.M., Bogolyubov D.S., Parfenov V.N. 2010. Interchromatin granule clusters of the scorpionfly oocytes contain poly(A)⁺ RNA, heterogeneous ribonucleoproteins A/B and mRNA export factor NXF1. Cell Biol. Int. 34: 1163—1170.

25. *Batalova F.M., Stepanova I.S., Skovorodkin I.N., Bogolyubov D.S., Parfenov V.N. 2005.* Identification and dynamics of Cajal bodies in relation to karyosphere formation in scorpionfly oocytes. *Chromosoma* 113: 428—439.
26. *Beck J.S. 1961.* Variations in the morphological patterns of «autoimmune» nuclear fluorescence. *Lancet*. 277: 1203—1205.
27. *Berezney R., Coffey D.S. 1974.* Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60: 1410—1417.
28. *Bogolyubov D. 2007.* Localization of RNA transcription sites in insect oocytes using microinjections of 5-bromouridine 5'-triphosphate. *Folia Histochem. Cytobiol.* 45: 129—134.
29. *Bogolyubov D., Alexandrova O., Tsvetkov A., Parfenov V. 2000.* An immunoelectron study of karyosphere and nuclear bodies in oocytes of mealworm beetle, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Polyphaga). *Chromosoma*. 109: 415—425.
30. *Bogolyubov D.S., Batalova F.M., Kiselyov A.M., Stepanova I.S. 2013.* Nuclear structures in *Tribolium castaneum* oocytes. *Cell Biol. Int.* 37: 1061—1079.
31. *Bogolyubov D., Parfenov V. 2001.* Immunogold localization of RNA polymerase II and pre-mRNA splicing factors in *Tenebrio molitor* oocyte nuclei with special emphasis on karyosphere development. *Tissue Cell*. 33: 549—561.
32. *Bogolyubov D., Parfenov V. 2008.* Structure of the insect oocyte nucleus with special reference to interchromatin granule clusters and cajal bodies. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 269: 59—110.
33. *Bogolyubov D., Stepanova I. 2007.* Interchromatin granule clusters in vitellogenic oocytes of the flesh fly, *Sarcophaga* sp. *Folia Histochem. Cytobiol.* 45: 401—403.
34. *Bogolyubov D., Stepanova I., Parfenov V. 2009.* Universal nuclear domains of somatic and germ cells: some lessons from oocyte interchromatin granule cluster and Cajal body structure and molecular composition. *BioEssays*. 31: 400—409.
35. *Bogolyubova I., Bogolyubov D., Parfenov V. 2009.* Localization of poly(A)(+) RNA and mRNA export factors in interchromatin granule clusters of two-cell mouse embryos. *Cell Tissue Res.* 338: 271—281.
36. *Short Protocols in Cell Biology. 2003, ed. by Bonifacino J., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz J., Yamada K.M. Current Protocols in Cell Biology Online. John Wiley & Sons. 826 p.*
37. *Brahms H., Raymackers J., Union A., de Keyser F., Meheus L., Lührmann R. 2000.* The C-terminal RG dipeptide repeats of the spliceosomal Sm proteins D1

and D3 contain symmetrical dimethylarginines, which form a major B-cell epitope for anti-Sm autoantibodies. *J. Biol. Chem.* 275: 17122—17129.

38. *Brede G., Solheim J., Prydz H.* 2002. PSKH1, a novel splice factor compartment-associated serine kinase. *Nucleic Acids Res.* 30: 5301—5309.

39. *Broers J.L., Machiels B.M., van Eys G.J., Kuijpers H.J., Manders E.M., van Driel R., Ramaekers F.C.* 1999. Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J. Cell Sci.* 112 (20): 3463—3475.

40. *Brown J.M., Green J., das Neves R.P., Wallace H.A.C., Smith A.J.H., Hughes J., Gray N., Taylor S., Wood W.G., Higgs D.R., et al.* 2008. Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment. *J. Cell Biol.* 182: 1083—1097.

41. *Cheng H., Dufu K., Lee C.-S., Hsu J.L., Dias A., Reed R.* 2006. Human mRNA export machinery recruited to the 5'-end of mRNA. *Cell.* 127: 1389—1400.

42. *Cmarko D., Verschure P.J., Martin T.E., Dahmus M.E., Krause S., Fu X.D., van Driel R., Fakan S.* 1999. Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. *Mol. Biol. Cell.* 10: 211—223.

43. *Conti E., Izaurralde E.* 2005. Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 316—325.

44. *Cui Y., Hagan K.W., Zhang S., Peltz S.W.* 1995. Identification and characterization of genes that are required for the accelerated degradation of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev.* 9: 423—436.

45. *Culbertson M.R.* 1999. RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends Genet.* 15: 74—80.

46. *Cummings M.R., King R.C.* 1969. The cytology of the vitellogenic stages of oogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. General staging characteristics. *J. Morphol.* 128: 427—441.

47. *Czaplinski K., Ruiz-Echevarria M.J., Paushkin S.V., Han X., Weng Y., Perlick H.A., Dietz H.C., Ter-Avanesyan M.D., Peltz S.W.* 1998. The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes Dev.* 12: 1665—1677.

48. *Dechat T., Adam S.A., Taimen P., Shimi T., Goldman R.D.* 2010. Nuclear lamins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (11): a000547.

49. *Derjusheva S., Kurganova A., Krasikova A., Saifitdinova A., Habermann F.A., Gaginskaya E.* 2003. Precise identification of chicken chromosomes in the

- lampbrush form using chromosome painting probes. *Chromosome Res.* 11: 749—757.
50. *Diem M.D., Chan C.C., Younis I., Dreyfuss G. 2007.* PYM binds the cytoplasmic exon-junction complex and ribosomes to enhance translation of spliced mRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14: 1173—1179.
51. *Djagaeva I., Doronkin S., Beckendorf S.K. 2005.* Src64 is involved in fusome development and karyosome formation during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Biol.* 284: 143—156.
52. *Dostie J., Dreyfuss G. 2002.* Translation is required to remove Y14 from mRNAs in the cytoplasm. *Curr. Biol.* 12: 1060—1067.
53. *Dostie J., Lejbkiewicz F., Sonenberg N. 2000.* Nuclear eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) colocalizes with splicing factors in speckles. *J. Cell Biol.* 148: 239—247.
54. *Dreyfuss G., Kim V.N., Kataoka N. 2002.* Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 195—205.
55. *Dreyfuss G., Matunis M.J., Piñol-Roma S., Burd C.G. 1993.* hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 289—321.
56. *Drummond D.R., Armstrong J., Colman A. 1985.* The effect of capping and polyadenylation on the stability, movement and translation of synthetic messenger RNAs in *Xenopus* oocytes. *Nucleic Acids Res.* 13: 7375—7394.
57. *Dundr M., Misteli T. 2001.* Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem. J.* 356: 297—310.
58. *Edström J.-E. 1960.* Composition of ribonucleic acid from various parts of spider oocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8: 47—51.
59. *van Eeden F.J., Palacios I.M., Petronczki M., Weston M.J., St Johnston D. 2001.* Barentsz is essential for the posterior localization of oskar mRNA and colocalizes with it to the posterior pole. *J. Cell Biol.* 154: 511—523.
60. *Evan G.I., Lewis G.K., Ramsay G., Bishop J.M. 1985.* Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* 5: 3610—3616.
61. *Fadloun A., Le Gras S., Jost B., Ziegler-Birling C., Takahashi H., Gorab E., Carninci P., Torres-Padilla M.-E. 2013.* Chromatin signatures and retrotransposon profiling in mouse embryos reveal regulation of LINE-1 by RNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20: 332—338.

62. *Fakan S. 1994.* Perichromatin fibrils are *in situ* forms of nascent transcripts. *Trends Cell Biol.* 4: 86—90.
63. *Fakan S., van Driel R. 2007.* The perichromatin region: a functional compartment in the nucleus that determines large-scale chromatin folding. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18: 676—681.
64. *Fasken M.B., Corbett A.H. 2005.* Process or perish: quality control in mRNA biogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12: 482—488.
65. *Fiil A. 1974.* Structural and functional modifications of the nucleus during oogenesis in the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Cell Sci.* 14: 51—67.
66. *Fiil A. 1976.* Polycomplexes and intranuclear annulate lamellae in mosquito oocytes. *Hereditas.* 84: 117—120.
67. *Fiil A., Moens P.B. 1973.* The development, structure and function of modified synaptonemal complexes in mosquito oocytes. *Chromosoma.* 41: 37—62.
68. *Frischmeyer P.A., Dietz H.C. 1999.* Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum. Mol. Genet.* 8: 1893—1900.
69. *Fu X. 1995.* The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA.* 1: 663—680.
70. *Fu X., Maniatis T. 1990.* Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature.* 343: 437—441.
71. *Galindo M.I., Pueyo J.I., Fouix S., Bishop S.A., Couso J.P. 2007.* Peptides encoded by short ORFs control development and define a new eukaryotic gene family. *PLoS Biol.* 5: e106.
72. *Gilbert S.F. 2000.* Developmental biology. Sunderland: Sinauer Associates. 695 pp.
73. *Giorgi C., Moore M.J. 2007.* The nuclear nurture and cytoplasmic nature of localized mRNPs. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18: 186—193.
74. *Goodman C.L., Stanley D., Ringbauer J.A., Beeman R.W., Silver K., Park Y. 2012.* A cell line derived from the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 48: 426—433.
75. *Grace T.D.C. 1962.* Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature.* 195: 788—789.

76. Grimson A., O'Connor S., Newman C.L., Anderson P. 2004. SMG-1 is a phosphatidylinositol kinase-related protein kinase required for nonsense-mediated mRNA decay in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Biol.* 24: 7483—7490.
77. Grosse R., Vartiainen M.K. 2013. To be or not to be assembled: progressing into nuclear actin filaments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 693—697.
78. Gruzova M.N. 1988. The nucleus during oogenesis with special reference to extrachromosomal structures. In: *Oocyte growth and maturation*. NY., Springer-Verlag, 77—163.
79. Gruzova M.N., Parfenov V.N. 1977. Ultrastructure of late oocyte nuclei in *Rana temporaria*. *J. Cell Sci.* 28: 1—13.
80. Gruzova M.N., Parfenov V.N. 1993. Karyosphere in oogenesis and intranuclear morphogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 144: 1—52.
81. Gudikote J.P., Imam J.S., Garcia R.F., Wilkinson M.F. 2005. RNA splicing promotes translation and RNA surveillance. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12: 801—809.
82. Guelen L., Pagie L., Brasset E., Meuleman W., Faza M.B., Talhout W., Eussen B.H., de Klein A., Wessels L., de Laat W., et al. 2008. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*. 453: 948—951.
83. Hachet O., Ephrussi A. 2001. *Drosophila* Y14 shuttles to the posterior of the oocyte and is required for *oskar* mRNA transport. *Curr. Biol.* 11: 1666—1674.
84. Hachet O., Ephrussi A. 2004. Splicing of *oskar* RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature*. 428: 959—963.
85. Hall L.L., Smith K.P., Byron M., Lawrence J.B. 2006. Molecular anatomy of a speckle. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 288: 664—675.
86. Hancock R. 2000. A new look at the nuclear matrix. *Chromosoma*. 109: 219—225.
87. Handwerger K.E., Gall J.G. 2006. Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends Cell Biol.* 16: 19—26.
88. He Y., Smith R. 2009. Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 1239—1256.
89. Hentze M.W., Kulozik A.E. 1999. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell*. 96: 307—310.
90. Hille B. 1984. Ionic channels of excitable membranes. Sunderland: Sinauer Associates. 426 p.

91. *Ho D.N., Coburn G.A., Kang Y., Cullen B.R., Georgiadis M.M. 2002.* The crystal structure and mutational analysis of a novel RNA-binding domain found in the human Tap nuclear mRNA export factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 1888—1893.
92. *Holbrook J.A., Neu-Yilik G., Hentze M.W., Kulozik A.E. 2004.* Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat. Genet.* 36: 801—808.
93. *Horn C., Schmid B.G.M., Pogoda F.S., Wimmer E.A. 2002.* Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1221—1235.
94. *Hourcade D., Dressler D., Wolfson J. 1973.* The amplification of ribosomal RNA genes involves a rolling circle intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70: 2926—2930.
95. *Hoy M.A. 2013.* Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications. Academic Press. 838 p.
96. *Huang S., Deerinck T.J., Ellisman M.H., Spector D.L. 1994.* *In vivo* analysis of the stability and transport of nuclear poly(A)⁺ RNA. *J. Cell Biol.* 126: 877—899.
97. *Huang S., Spector D.L. 1991.* Nascent pre-mRNA transcripts are associated with nuclear regions enriched in splicing factors. *Genes Dev.* 5: 2288—2302.
98. *Hulsebos T.J., Hackstein J.H., Hennig W. 1984.* Lampbrush loop-specific protein of *Drosophila hydei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81: 3404—3408.
99. *Hutchinson J.N., Ensminger A.W., Clemson C.M., Lynch C.R., Lawrence J.B., Chess A. 2007.* A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC Genomics.* 8: 39.
100. *Ibba M., Söll D. 1999.* Quality control mechanisms during translation. *Science.* 286: 1893—1897.
101. *Ishihama Y., Tadakuma H., Tani T., Funatsu T. 2008.* The dynamics of pre-mRNAs and poly(A)⁺ RNA at speckles in living cells revealed by iFRAP studies. *Exp. Cell Res.* 314: 748—762.
102. *Ivanovska I., Khandan T., Ito T., Orr-Weaver T.L. 2005.* A histone code in meiosis: the histone kinase, NHK-1, is required for proper chromosomal architecture in *Drosophila* oocytes. *Genes Dev.* 19: 2571—2582.
103. *Jiang X., Peery A., Hall A., Sharma A., Chen X.-G., Waterhouse R.M., Komissarov A., Riehl M.M., Shouche Y., Sharakhova M.V., et al. 2014.* Genome analysis of a major urban malaria vector mosquito, *Anopheles stephensi*. *Genome Biol.* 15: 459.

104. *Johnson C., Primorac D., McKinstry M., McNeil J., Rowe D., Lawrence J.B. 2000.* Tracking COL1A1 RNA in osteogenesis imperfecta. splice-defective transcripts initiate transport from the gene but are retained within the SC35 domain. *J. Cell Biol.* 150: 417—432.
105. *Johnson I.S. 1983.* Human insulin from recombinant DNA technology. *Science.* 219: 632—637.
106. *Jordan P., Cunha C., Carmo-Fonseca M. 1997.* The cdk7-cyclin H-MAT1 complex associated with TFIIF is localized in coiled bodies. *Mol. Biol. Cell.* 8: 1207—1217.
107. *Jurica M.S., Moore M.J. 2003.* Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol. Cell.* 12: 5—14.
108. *Kashima I., Yamashita A., Izumi N., Kataoka N., Morishita R., Hoshino S., Ohno M., Dreyfuss G., Ohno S. 2006.* Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 20: 355—367.
109. *Kataoka N., Diem M.D., Kim V.N., Yong J., Dreyfuss G. 2001.* Magoh, a human homolog of *Drosophila* mago nashi protein, is a component of the splicing-dependent exon-exon junction complex. *EMBO J.* 20: 6424—6433.
110. *Kataoka N., Diem M.D., Yoshida M., Hatai C., Dobashi I., Dreyfuss G., Hagiwara M., Ohno M. 2011.* Specific Y14 domains mediate its nucleocytoplasmic shuttling and association with spliced mRNA. *Sci. Rep.* 1: 92.
111. *Kataoka N., Yong J., Kim V.N., Velazquez F., Perkinson R.A., Wang F., Dreyfuss G. 2000.* Pre-mRNA splicing imprints mRNA in the nucleus with a novel RNA-binding protein that persists in the cytoplasm. *Mol. Cell.* 6: 673—682.
112. *Kawano M., Kawaji H., Grandjean V., Kiani J., Rassoulzadegan M. 2012.* Novel small noncoding RNAs in mouse spermatozoa, zygotes and early embryos. *PloS One.* 7: e44542.
113. *Kim W.Y., Dahmus M.E. 1986.* Immunochemical analysis of mammalian RNA polymerase II subspecies. Stability and relative *in vivo* concentration. *J. Biol. Chem.* 261: 14219—14225.
114. *Kim V.N., Yong J., Kataoka N., Abel L., Diem M.D., Dreyfuss G. 2001.* The Y14 protein communicates to the cytoplasm the position of exon-exon junctions. *EMBO J.* 20: 2062—2068.
115. *Kiseleva E., Drummond S.P., Goldberg M.W., Rutherford S.A., Allen T.D., Wilson K.L. 2004.* Actin- and protein-4.1-containing filaments link nuclear pore complexes to subnuclear organelles in *Xenopus* oocyte nuclei. *J. Cell Sci.* 117: 2481—2490.

116. *Klowden M.J.* 2007. Physiological systems in insects. Amsterdam-Boston: Elsevier/Academic Press. 688 p.
117. *Krainer A.R.* 1988. Pre-mRNA splicing by complementation with purified human U1, U2, U4/U6 and U5 snRNPs. *Nucleic Acids Res.* 16: 9415—9429.
118. *Krecic A.M., Swanson M.S.* 1999. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 363—371.
119. *Kronvall G., Myhre E.* 1977. Differential staining of bacteria in clinical specimens using acridine orange buffered at low pH. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B.* 85: 249—254.
120. *Kruhlak M.J., Lever M.A., Fischle W., Verdin E., Bazett-Jones D.P., Hendzel M.J.* 2000. Reduced mobility of the alternate splicing factor (ASF) through the nucleoplasm and steady state speckle compartments. *J. Cell Biol.* 150: 41—51.
121. *Kukalev A., Nord Y., Palmberg C., Bergman T., Percipalle P.* 2005. Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase II. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12: 238—244.
122. *Lafarga M., Berciano M.T., Hervas J.P., Villegas J.* 1989. Nucleolar organization in granule cell neurons of the rat cerebellum. *J. Neurocytol.* 18: 19—26.
123. *Lamond A.I., Spector D.L.* 2003. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 605—612.
124. *Lau C.-K., Diem M.D., Dreyfuss G., Van Duyne G.D.* 2003. Structure of the Y14-Magoh core of the exon junction complex. *Curr. Biol.* 13: 933—941.
125. *Le Hir H., Gatfield D., Izaurralde E., Moore M.J.* 2001a. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J.* 20: 4987—4997.
126. *Le Hir H., Gatfield D., Braun I.C., Forler D., Izaurralde E.* 2001b. The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization. *EMBO Rep.* 2: 1119—1124.
127. *Le Hir H., Izaurralde E., Maquat L.E., Moore M.J.* 2000. The spliceosome deposits multiple proteins 20—24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J.* 19: 6860—6869.
128. *Le Hir H., Nott A., Moore M.J.* 2003. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem. Sci.* 28: 215—220.

129. Lee B.S., Culbertson M.R. 1995. Identification of an additional gene required for eukaryotic nonsense mRNA turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 10354—10358.
130. Leeds P., Wood J.M., Lee B.S., Culbertson M.R. 1992. Gene products that promote mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12: 2165—2177.
131. Lejeune F., Maquat L.E. 2005. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 309—315.
132. Lerner E., Lerner M., Janeway C., Steitz J. 1981. Monoclonal antibodies to nucleic acid-containing cellular constituents: probes for molecular biology and autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78: 2737—2741.
133. Li S., Wilkinson M.F. 1998. Nonsense surveillance in lymphocytes? *Immunity*. 8: 135—141.
134. Liu J.-L., Buszczak M., Gall J.G. 2006. Nuclear bodies in the *Drosophila* germinal vesicle. *Chromosome Res.* 14: 465—475.
135. Liu J.-L., Wu Z., Nizami Z., Deryusheva S., Rajendra T.K., Beumer K.J., Gao H., Matera A.G., Carroll D., Gall J.G. 2009. Coilin is essential for cajal body organization in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Cell.* 20: 1661—1670.
136. Lorenzen M.D., Kimzey T., Shippy T.D., Brown S.J., Denell R.E., Beeman R.W. 2007. *piggyBac*-based insertional mutagenesis in *Tribolium castaneum* using donor/helper hybrids. *Insect Mol. Biol.* 16: 265—275.
137. Ma X.M., Yoon S.-O., Richardson C.J., Jülich K., Blenis J. 2008. SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell*. 133: 303—313.
138. Maderspacher F. 2008. Genomics: An inordinate fondness for beetles. *Curr. Biol.* 18: R466—R468.
139. Majlessi M., Nelson N.C., Becker M.M. 1998. Advantages of 2'-O-methyl oligoribonucleotide probes for detecting RNA targets. *Nucleic Acids Res.* 26: 2224—2229.
140. Malyavantham K.S., Bhattacharya S., Alonso W.D., Acharya R., Berezney R. 2008. Spatio-temporal dynamics of replication and transcription sites in the mammalian cell nucleus. *Chromosoma*. 117: 553—567.
141. Mao Y.S., Zhang B., Spector D.L. 2011. Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet.* 27: 295—306.

142. Maquat L.E. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 89—99.
143. Maquat L.E., Carmichael G.G. 2001. Quality control of mRNA function. *Cell.* 104: 173—176.
144. Maranga L., Coroadinha A.S., Carrondo M.J.T. 2002. Insect cell culture medium supplementation with fetal bovine serum and bovine serum albumin: effects on baculovirus adsorption and infection kinetics. *Biotechnol. Prog.* 18: 855—861.
145. Markaki Y., Gunkel M., Schermelleh L., Beichmanis S., Neumann J., Heidemann M., Leonhardt H., Eick D., Cremer C., Cremer T. 2010. Functional nuclear organization of transcription and DNA replication: a topographical marriage between chromatin domains and the interchromatin compartment. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 75: 475—492.
146. Maslova A., Krasikova A. 2012. Nuclear actin depolymerization in transcriptionally active avian and amphibian oocytes leads to collapse of intranuclear structures. *Nucleus.* 3: 300—311.
147. Melcer S., Gruenbaum Y., Krohne G. 2007. Invertebrate lamins. *Exp. Cell Res.* 313: 2157—2166.
148. Micklem D.R., Dasgupta R., Elliott H., Gergely F., Davidson C., Brand A., González-Reyes A., St Johnston D. 1997. The mago nashi gene is required for the polarisation of the oocyte and the formation of perpendicular axes in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 7: 468—478.
149. Mingot J.M., Kostka S., Kraft R., Hartmann E., Görlich D. 2001. Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J.* 20: 3685—3694.
150. Mintz P.J., Patterson S.D., Neuwald A.F., Spahr C.S., Spector D.L. 1999. Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters. *EMBO J.* 18: 4308—4320.
151. Misteli T. 2001. Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science.* 291: 843—847.
152. Misteli T., Cáceres J.F., Spector D.L. 1997. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature.* 387: 523—527.
153. Misteli T., Spector D.L. 1998. The cellular organization of gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 323—331.
154. Mohr S.E., Dillon S.T., Boswell R.E. 2001. The RNA-binding protein Tsunagi interacts with Mago Nashi to establish polarity and localize *oskar* mRNA during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.* 15: 2886—2899.

155. Molenaar C., Abdulle A., Gena A., Tanke H.J., Dirks R.W. 2004. Poly(A)⁺ RNAs roam the cell nucleus and pass through speckle domains in transcriptionally active and inactive cells. *J. Cell Biol.* 165: 191—202.
156. Molenaar C., Marras S.A., Slat J.C., Truffert J.C., Lemaître M., Raap A.K., Dirks R.W., Tanke H.J. 2001. Linear 2'O-Methyl RNA probes for the visualization of RNA in living cells. *Nucleic Acids Res.* 29: E89—89.
157. Monneron A., Bernhard W. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.* 27: 266—288.
158. Moore M.J. 2005. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science.* 309: 1514—1518.
159. Moore G.E., Gerner R.E., Franklin H.A. 1967. Culture of normal human leukocytes. *JAMA.* 199: 519—524.
160. Morey C., Avner P. 2004. Employment opportunities for non-coding RNAs. *FEBS Lett.* 567: 27—34.
161. Murashev B., Kazennova E., Kozlov A., Murasheva I., Dukhovlinova E., Galachyants Y., Dorofeeva E., Dukhovlinov I., Smirnova G., Masharsky A., et al. 2007. Immunogenicity of candidate DNA vaccine based on subtype A of human immunodeficiency virus type 1 predominant in Russia. *Biotechnol. J.* 2: 871—878.
162. Newmark P.A., Boswell R.E. 1994. The *mago nashi* locus encodes an essential product required for germ plasm assembly in *Drosophila*. *Development.* 120: 1303—1313.
163. Newmark P.A., Mohr S.E., Gong L., Boswell R.E. 1997. *mago nashi* mediates the posterior follicle cell-to-oocyte signal to organize axis formation in *Drosophila*. *Development.* 124: 3197—3207.
164. Nizami Z., Deryusheva S., Gall J.G. 2010. The Cajal body and histone locus body. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2: a000653—a000653.
165. Nott A., Le Hir H., Moore M.J. 2004. Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. *Genes Dev.* 18: 210—222.
166. Nüsslein-Volhard C., Wieschaus E. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 287: 795—801.
167. Page M.F., Carr B., Anders K.R., Grimson A., Anderson P. 1999. SMG-2 is a phosphorylated protein required for mRNA surveillance in *Caenorhabditis elegans* and related to Upflp of yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19: 5943—5951.

168. *Palacios I.M.* 2002. RNA processing: splicing and the cytoplasmic localisation of mRNA. *Curr. Biol.* 12: R50—R52.
169. *Palacios I.M., Gatfield D., St Johnston D., Izaurralde E.* 2004. An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. *Nature.* 427: 753—757.
170. *Parfenov V., Davis D., Pochukalina G., Sample C., Bugaeva E., Murti K.* 1995. Nuclear actin filaments and their topological changes in frog oocytes. *Exp. Cell Res.* 217: 385—394.
171. *Parfenov V., Potchukalina G., Dudina I., Kostyuchek D., Gruzova M.* 1989. Human antral follicles: oocyte nucleus and the karyosphere formation (electron microscopic and autoradiographic data). *Gamete Res.* 22: 219—231.
172. *Patel S.B., Bellini M.* 2008. The assembly of a spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nucleic Acids Res.* 36: 6482—6493.
173. *Pavlopoulos A., Berghammer A.J., Averof M., Klingler M.* 2004. Efficient transformation of the beetle *Tribolium castaneum* using the *Minos* transposable element: quantitative and qualitative analysis of genomic integration events. *Genetics.* 167: 737—746.
174. *Pederson T.* 2000. Half a century of the «nuclear matrix». *Mol. Biol. Cell.* 11: 799—805.
175. *Peel A.D.* 2009. Forward genetics in *Tribolium castaneum*: opening new avenues of research in arthropod biology. *J. Biol.* 8: 106.
176. *Peric-Hupkes D., van Steensel B.* 2010. Role of the nuclear lamina in genome organization and gene expression. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 75: 517—524.
177. *Phair R.D., Misteli T.* 2000. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature.* 404: 604—609.
178. *Pickersgill H., Kalverda B., de Wit E., Talhout W., Fornerod M., van Steensel B.* 2006. Characterization of the *Drosophila melanogaster* genome at the nuclear lamina. *Nat. Genet.* 38: 1005—1014.
179. *Podgornaya O.I., Voronin A.P., Erukashvily N.I., Matveev I.V., Lobov I.B.* 2003. Structure-specific DNA-binding proteins as the foundation for three-dimensional chromatin organization. *Int. Rev. Cytol.* 224: 227—296.
180. *Politz J.C.R., Tuft R.A., Pederson T.* 2006. Photoactivation-based labeling and *in vivo* tracking of RNA molecules in the nucleus. *Cold Spring Harb. Protoc.* 6.

181. Probst A.V., Okamoto I., Casanova M., El Marjou F., Le Baccon P., Almouzni G. 2010. A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Dev. Cell.* 19: 625—638.
182. Pultz M.A., Zimmerman K.K., Alto N.M., Kaeberlein M., Lange S.K., Pitt J.N., Reeves N.L., Zehrung D.L. 2000. A genetic screen for zygotic embryonic lethal mutations affecting cuticular morphology in the wasp *Nasonia vitripennis*. *Genetics.* 154: 1213—1229.
183. Puvion E., Moyne G. 1981. *In situ* localization of RNA structures. *Cell Nucl.* 8: 59—115.
184. Puvion E., Puvion-Dutilleul F. 1996. Ultrastructure of the nucleus in relation to transcription and splicing: roles of perichromatin fibrils and interchromatin granules. *Exp. Cell Res.* 229: 217—225.
185. Raška I., Dundr M., Koberna K. 1992. Structure-function subcompartments of the mammalian cell nucleus as revealed by the electron microscopic affinity cytochemistry. *Cell Biol. Int. Rep.* 16: 771—789.
186. Reichert V.L., Le Hir H., Jurica M.S., Moore M.J. 2002. 5' exon interactions within the human spliceosome establish a framework for exon junction complex structure and assembly. *Genes Dev.* 16: 2778—2791.
187. Richards S., Gibbs R.A., Weinstock G.M., Brown S.J., Denell R., Beeman R.W., Gibbs R., Beeman R.W., Brown S.J., Bucher G., et al. 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature.* 452: 949—955.
188. Rozen S., Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132: 365—386.
189. Rübsam R., Büning J. 2001. F-actin is a component of the karyosome in neuropteran oocyte nuclei. *Arthropod Struct. Dev.* 30: 125—133.
190. Saifitdinova A., Derjusheva S., Krasikova A., Guginskaya E. 2003. Lampbrush chromosomes of the chaffinch (*Fringilla coelebs* L.). *Chromosome Res.* 11: 99—113.
191. Saitoh N., Spahr C.S., Patterson S.D., Bubulya P., Neuwald A.F., Spector D.L. 2004. Proteomic analysis of interchromatin granule clusters. *Mol. Biol. Cell.* 15: 3876—3890.
192. Sambrook J., Russel D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual.* NY.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2100 p.

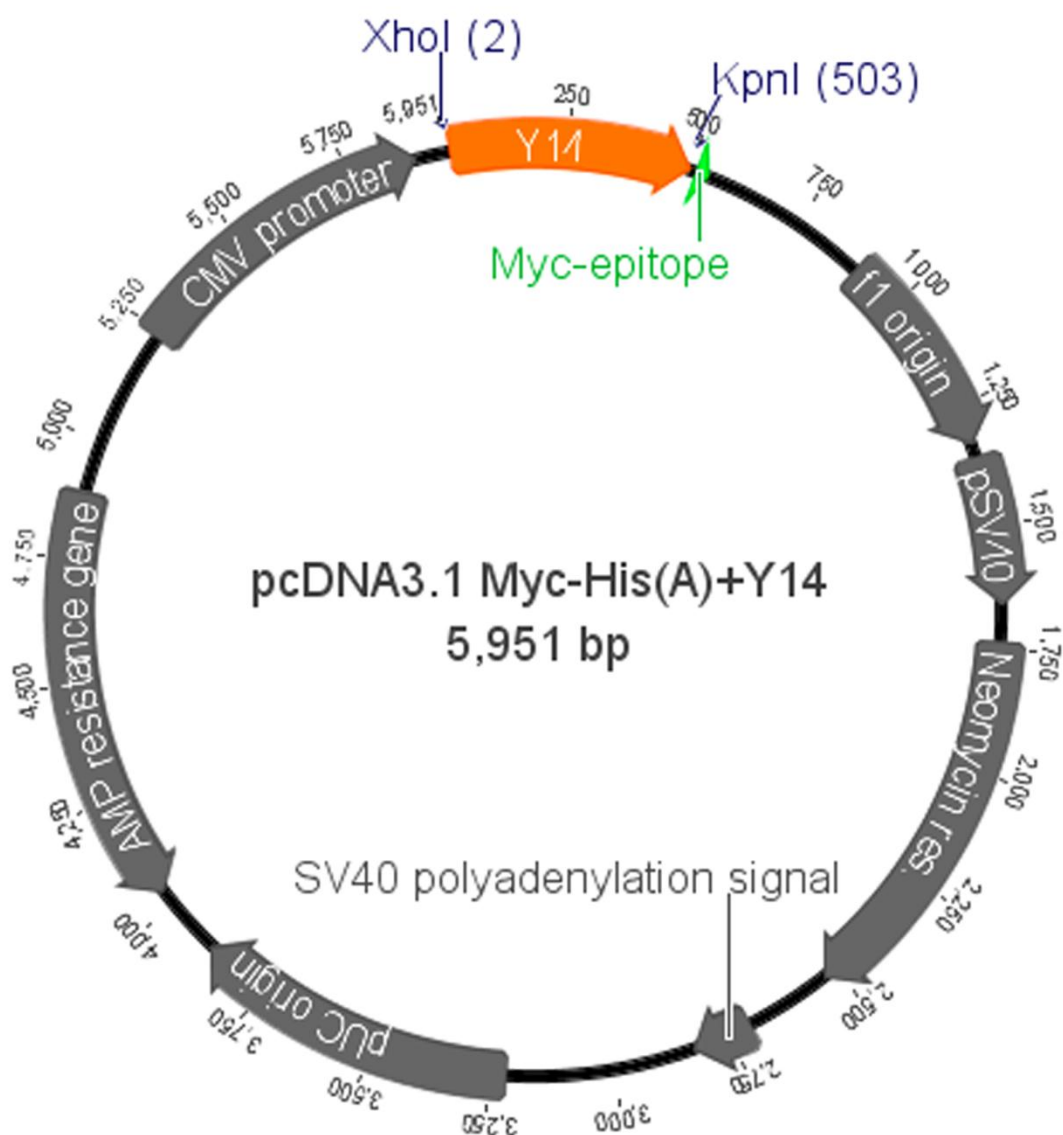
193. *Schmidt U., Richter K., Berger A.B., Lichter P. 2006. In vivo BiFC analysis of Y14 and NXF1 mRNA export complexes: preferential localization within and around SC35 domains. J. Cell Biol. 172: 373—381.*
194. *Schoenberg D.R., Maquat L.E. 2012. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. Nat. Rev. Genet. 13 (4): 246—259.*
195. *Schul W., van Der Kraan I., Matera A.G., van Driel R., de Jong L. 1999. Nuclear domains enriched in RNA 3'-processing factors associate with coiled bodies and histone genes in a cell cycle-dependent manner. Mol. Biol. Cell. 10: 3815—3824.*
196. *Schul W., Groenhout B., Koberna K., Takagaki Y., Jenny A., Manders E.M., Raška I., van Driel R., de Jong L. 1996. The RNA 3' cleavage factors CstF 64 kDa and CPSF 100 kDa are concentrated in nuclear domains closely associated with coiled bodies and newly synthesized RNA. EMBO J. 15: 2883—2892.*
197. *Shibuya T., Tange T.Ø., Sonenberg N., Moore M.J. 2004. eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. Nat. Struct. Mol. Biol. 11: 346—351.*
198. *Shopland L.S., Johnson C.V., Byron M., McNeil J., Lawrence J.B. 2003. Clustering of multiple specific genes and gene-rich R-bands around SC-35 domains: evidence for local euchromatic neighborhoods. J. Cell Biol. 162: 981—990.*
199. *Shyu A.B., Wilkinson M.F. 2000. The double lives of shuttling mRNA binding proteins. Cell. 102: 135—138.*
200. *Spector D.L. 1993. Macromolecular domains within the cell nucleus. Annu. Rev. Cell Biol. 9: 265—315.*
201. *Spector D.L., Fu X.D., Maniatis T. 1991. Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. EMBO J. 10: 3467—3481.*
202. *Spector D.L., Lamond A.I. 2011. Nuclear Speckles. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3: a000646*
203. *Strässer K., Hurt E. 2000. Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding protein, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export. EMBO J. 19: 410—420.*
204. *Stutz F., Bachi A., Doerks T., Braun I.C., Seraphin B., Wilm M., Bork P., Izaurralde E. 2000. REF, an evolutionarily conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export. RNA. 6: 638—650.*

205. *Stuurman N., Heins S., Aebi U. 1998.* Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J. Struct. Biol.* 122: 42—66.
206. *Sulston I.A., Anderson K.V. 1996.* Embryonic patterning mutants of *Tribolium castaneum*. *Development.* 122: 805—814.
207. *Świątek P. 1999.* Formation of the karyosome in developing oocytes of weevils (Coleoptera, Curculionidae). *Tissue Cell.* 31: 587—593.
208. *Świątek P., Jaglarz M.K. 2004.* snRNPs are present in the karyosome capsule in the weevil germinal vesicle. *Tissue Cell.* 36: 253—262.
209. *Swift H. 1959.* Studies on nuclear fine structure. *Brookhaven Symp. Biol.* 12: 134—152.
210. *Swift H. 1963.* Cytochemical studies on nuclear fine structure. *Exp. Cell Res.* 24 (Suppl 9): 54—67.
211. *Tange T.Ø., Shibuya T., Jurica M.S., Moore M.J. 2005.* Biochemical analysis of the EJC reveals two new factors and a stable tetrameric protein core. *RNA.* 11: 1869—1883.
212. *Thiry M. 1992.* Ultrastructural detection of DNA within the nucleolus by sensitive molecular immunocytochemistry. *Exp. Cell Res.* 200: 135—144.
213. *Tomoyasu Y., Miller S.C., Tomita S., Schoppmeier M., Grossmann D., Bucher G. 2008.* Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biol.* 9: R10.
214. *Trauner J., Büning J. 2007.* Germ-cell cluster formation in the telotrophic meroistic ovary of *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Polyphaga, Tenebrionidae) and its implication on insect phylogeny. *Dev. Genes Evol.* 217: 13—27.
215. *Trauner J., Schinko J., Lorenzen M.D., Shippey T.D., Wimmer E.A., Beeman R.W., Klingler M., Bucher G., Brown S.J. 2009.* Large-scale insertional mutagenesis of a coleopteran stored grain pest, the red flour beetle *Tribolium castaneum*, identifies embryonic lethal mutations and enhancer traps. *BMC Biol.* 7: 73.
216. *Tretter F., Cynader M., Singer W. 1975.* Modification of direction selectivity of neurons in the visual cortex of kittens. *Brain Res.* 84: 143—149.
217. *Trinkle-Mulcahy L., Sleeman J.E., Lamond A.I. 2001.* Dynamic targeting of protein phosphatase 1 within the nuclei of living mammalian cells. *J. Cell Sci.* 114: 4219—4228.

218. *Ullmann S.L. 1973. Oogenesis in *Tenebrio molitor*: histological and autoradiographical observations on pupal and adult ovaries. J. Embryol. Exp. Morphol. 30: 179—217.*
219. *Wei X., Somanathan S., Samarabandu J., Berezney R. 1999. Three-dimensional visualization of transcription sites and their association with splicing factor-rich nuclear speckles. J. Cell Biol. 146: 543—558.*
220. *Whiting M.F. 2002. Phylogeny of the holometabolous insect orders: molecular evidence. Zool. Scr. 31: 3—15.*
221. *Wiegand H.L., Lu S., Cullen B.R. 2003. Exon junction complexes mediate the enhancing effect of splicing on mRNA expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100: 11327—11332.*
222. *Will C.L., Lührmann R. 2001. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. Curr. Opin. Cell Biol. 13: 290—301.*
223. *Wu Z., Murphy C., Callan H., Gall J. 1991. Small nuclear ribonucleoproteins and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in the amphibian germinal vesicle: loops, spheres, and snurposomes. J. Cell Biol. 113: 465—483.*
224. *Xu H., Pillai R.S., Azzouz T.N., Shpargel K.B., Kambach C., Hebert M.D., Schümperli D., Matera A.G. 2005. The C-terminal domain of coilin interacts with Sm proteins and U snRNPs. Chromosoma. 114: 155—166.*
225. *Yamashita A., Kashima I., Ohno S. 2005. The role of SMG-1 in nonsense-mediated mRNA decay. Biochim. Biophys. Acta. 1754: 305—315.*
226. *Zenklusen D., Vinciguerra P., Strahm Y., Stutz F. 2001. The yeast hnRNP-Like proteins Yra1p and Yra2p participate in mRNA export through interaction with Mex67p. Mol. Cell. Biol. 21: 4219—4232.*
227. *Zhao X.F., Colaizzo-Anas T., Nowak N.J., Shows T.B., Elliott R.W., Aplan P.D. 1998. The mammalian homologue of mago nashi encodes a serum-inducible protein. Genomics. 47: 319—322.*
228. *Zhou Z.L., Luo M., Straesser K., Katahira J., Hurt E., Reed R. 2000. The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. Nature. 407: 401—405.*
229. *Zorn C., Cremer T., Cremer C., Zimmer J. 1976. Laser UV microirradiation of interphase nuclei and post-treatment with caffeine. A new approach to establish the arrangement of interphase chromosomes. Hum. Genet. 35: 83—89.*

8 Дополнительные материалы

Приложение 1. Карта и полный сиквенс плазмиды А.

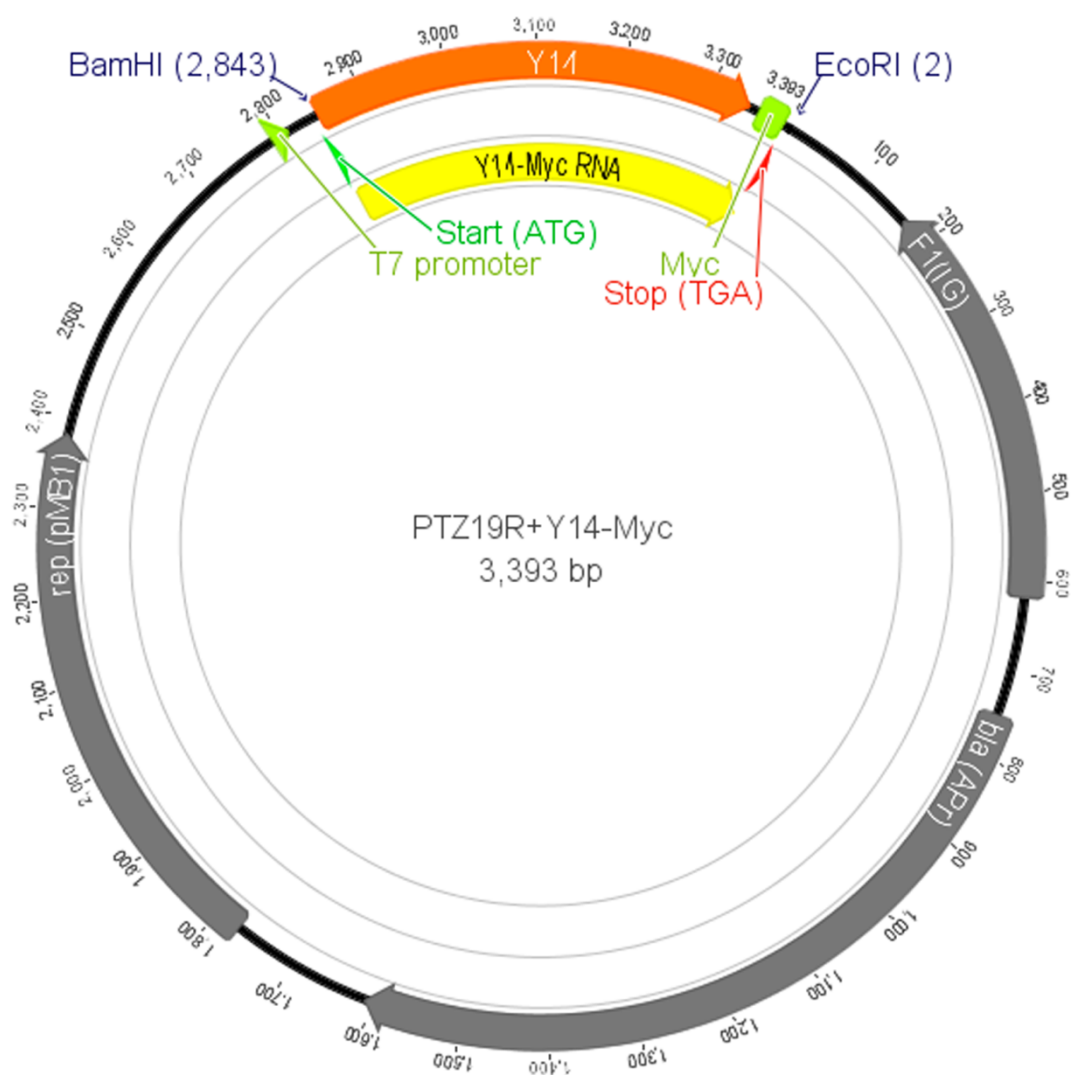


Название	Минимум	Максимум	Длина
XhoI	1	6	6
Y14	7	503	497
KpnI	498	503	6
Myc-epitope	516	545	30
f1 origin	898	1,326	429
pSV40	1,353	1,661	309
Neomycin resistance	1,736	2,53	795
SV40 polyadenylation signal	2,704	2,834	131
pUC origin	3,217	3,89	674
AMP resistance gene	4,035	4,895	861
CMV promoter	5,24	5,893	654

pcDNA3.1 Myc-His(A)+Y14

CTCAGATGGCGATGTTTTGGACATCAACGATTCCGTCGAATTGGACGTGAAGACGAAGGAGACCAGAGCGTTTTGCGCCTGAAAGATAAAGTTGT
AAAGCGGAAAGGTCGCGGCTTTGGGCCTGGAGAGACCAAGGAACATGAGAAATTCGAGGATATGAAGAGCATAGATTTCGCGGGATCACCAGAGACGAG
CCTGGGCCACAGAAATCTGTGGAGGGGTGGATTTGTTTGTGACTTCGGTGTCATGAAGAGGCCAGTGAGGATGATTGTAGTGAGAAAGTTTCCGAGT
TTGGGGCTATCAAAAATATAAGTATCAACTTGGATCGTCGGACGGGTTTTTGAAGGGATATGCTTTGTGATTGAATATGGACGTACAGGAAGCGTT
TGCGGCCAGGGAGGCTTTGAATGGGTCTTTGTGTTAGGGCAAACAGTTGGAGTTGACTGGTGTGTTTTGTTAAGGGGCCAAAAGTCAAGAAACGT
GCAAGGAGACACGGTACCAAGCTTGGGGCCGAACAAAATCATCTCAGAAGAGGATCTGAAATAGCGCCCTGCACCATCATCATCATCATATTGAG
TTTAAACGGTCTCCAGCTTAAGTTTAAACCCGTGATCAGCTCGACTGTCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTTGTCCTTCCCCCTCCCGCTTC
CTTGACCTTGGAAAGTGCCATCCCACTGCTCCTTCTCTTAATAAAATAGGAAATGATCGCATGTCATGTCAGTAGTGTGATCTTATCTTCTGGGGGT
GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGAAAGAACCA
GCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGGCATTAAGCGCGGGGGTGTGGTGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGGCCAG
CGCCCTAGCGCCGCTCCTTTCGTTTCTTCCCTTCTTCGCGACGTTGCGCGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCTTTTAGG
TTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCCTGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTACAGTAGTGGGCGCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCC
CTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGAAGTCTTGTTCACAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTTTGTATTATAAG
GATTTTGGCGATTTCGGCTATTTGGTTAAAAATGAGCTGATTTACACAAAAATTTAACCGCAATTAATCTGTGGAATGTGTCTAGTTAGGTTGTG
AAAGTCCCAGGCTCCCCAGTCAGGACGAGAAGTATGCAAGACTGCATCTCAATTAGTCAGCAACGAGGTGGAAGTCCCAGGCTCCCCAGCAGG
CAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCGCGCCCTAACTCCGCCCATCCGCGCCCTAACTCCGCGCAGTTCCGCCCCAT
TCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTATTTATGACAGAGCGCAGGCGCGCTCTGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTG
GAGGCTCAGGCTTCTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCCGATGATTGAACA
AGATGATTGTCAGCGAGGTTCTCCGGCCGCTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCGCGGTG
TTCCGGCTGTGACGCGCAGGGGCGCCCGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACAGGGCAGCGCGCTATCGT
GGCTGGCCACGACGGGCGTCTCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTCCCGGGCAGGA
TCTCTGTCACTCACTTGTCTCTGCGGAGAAATATCCCATGTCGTCATGCAATCGCGGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTCGCCATTCT
GACCACAATCGGAAACATGCATCGATGCGCGAGCAGCTACTCGGATGGAAGCCGCTTGTGTCGATCAGGATGATGACGAGAAAGACATCAGGGCTCG
CGCCAGCCGAACGTTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCTGCTTCCGCAATATCATGGT
GGAAATGGCGCTTTTCTGGATTATCATGCACTGTGGCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAA
GAGCTTGGCGGCAATGGGCTGACCGCTTCTCTCGTCTTACGGTATCGCCGCTCCGATTCGCGAGCGCATCGCCCTCTATCGCCTCTTTGACGAGT
TCTCTGAGCGGGCTCTGGGTTGTGAATGACCGACCAAGCGCCCACTGCCATCAGAGATTTCGATTCCACGCGCCCTCTATGAAAG
TTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCACTTGTATTG
CAGCTTATAATGGTTACAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTCTAGTCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCAT
CAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGTCATAGCTGTTCTCTGTGAAATTTGTTATCCGCTC
ACAATTTCCACAACATACGAGCGCGAAGCATAAAGTGTAAAGCTGGGGTGCATTAATGAGTGAGCTAACTACATTAATGTGCGTTCGCTCATGTC
CGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGATTATGGGCGCTCTTCGCTTC
CTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGCGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGCGGTAATACGTTATCCACAGAATCAGGGAT
AACGACGAAAGAAACATGTAGCAGCAAAAGGCCAGCAAAAGCCGAGCAAAAGCCGTAAGAAAGCCGCTTGTGCGCTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTCTG
ACAGCATACCAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGCATATAAAGATACAGAGGCTTTCCCCCTGGAAGCTCCTCTGTCG
CTCTCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTACGCTGTAGGTATCTC
AGTTTCGGTTAGGTCGTTTCGCTCAAGCTGGGCTGTGTGCAAGCAACCCCGTTACGCGCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACATATCGTCTAGT
CCAAACCGGTAAAGACGACTTATCGCCACTGGCAGCGCACTGTTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGATGTAGGCGGCTACAGAGTCTTGAA
GTGGTGGCTTAACCTACGCTTACATAGAAGAACGATTTTGGTATCTGCGCTTCTGCTGAAGCGAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGA
TCCGGCAAAACAAACCACGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCT
TTTTTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACAGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCTATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCCTTTTAA
TTAAAAATGAAGTTTAAATCAATCAAAGTATATAGTAATCTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGACCTATCTCAGCATC
TGCTTATTTCTGCTTACCATCAATTTGCTGCTACTCCCGCTGTGTTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGCTGCAATGATAC
CGCAGACCCACGCTCACGGCTCCAGATTCTCAGCAATAAACCCAGCCAGCGGAAGGGCCGAGGCGAGAGTGTGCTGCAACTTTATCCGCTC
CATCCAGTCTATTAAATTTGTTCCGGGAAGTACAGTAAGTATGTCGCGAGTTTGAAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTG
TCAAGCTCGTCTTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGTTTCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTAGCT
CCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCGCGCATGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCATGCATAATCTCTCTACTGTCTATGCCATC
CGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGTGTGAGTACTCAACCAAGTCATCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGTCTTGCCCGCGCTCAATACGG
GATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTAAAGTGCTCATCATTTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAGAGGATCTACCGCTGTTGAGAT
CAGATTTCGATTGATAACCCACTCGTGCGACCCAGTATCTTCAGATCTTTTACTTTCACGAGCTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGC
CGCAAAAAGGGAATAAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATG
AGCGGATACATATTTGAATGTATTAGAAAAATTAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGGAAAAGTGCCACCTGAGCTCGACGGATCGGGAG
ATCTCCCGATCCCCATAGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCGCGCATGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTTGGAGTTCGCT
GAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGTCAACAAAGGCAAGGCTTGACCGACAATGATGAAGAATCTGCTTAGGTTAGGCGTTTTCGCTGCTCTC
GCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGA
GTTCCGCGTTACATTAACTTACGTTAAATGGCCGCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCATTAATGACGATGTGTCCCATAGTA
ACCCATATAGGGAATTTCCATTGACGTCATAGGTTGGGTGAGTATTACGTTAACTGCCCATCTGGCAGTACATCAAGTATCATATGCAAGTACGC
CGCTATTGACGCTCAATGACGGTAATGCGCCGCTGCAATTAGCCAGTACATGACCTATGGGACTTTTCTACTGGCAGTACATCTACGTAATT
AGTCACTCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTCCAAGTCTCCACCCATT
GACGTCATGGGAGTTTGTTTTGGCAACAAAATACACGGGACTTTTCAAAAATGTGTTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGGT
TCAAGTGGGAGGCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAC
CCAAGCTGGCTAGGCTTTTAAACGGGCGCTCTAGA

Приложение 2. Карта и полный сиквенс плазмиды Б.

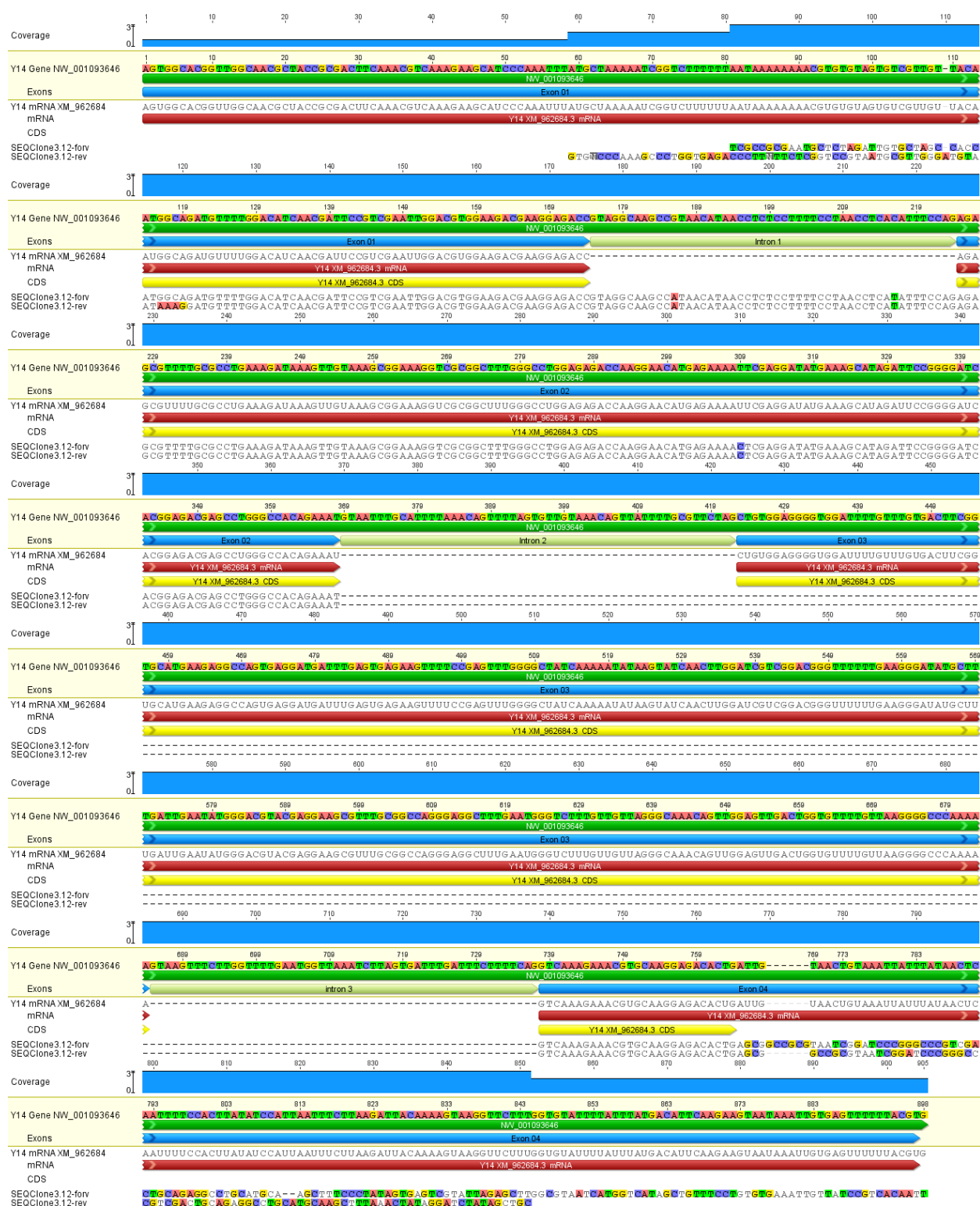


Название	Минимум	Максимум	Длина
EcoRI	1	6	6
F1(IG)	164	619	456
bla (APr)	751	1,611	861
rep (pMB1)	1,771	2,385	615
T7 promoter	2,791	2,811	21
BamHI	2,842	2,847	6
Y14	2,848	3,346	499
Start (ATG)	2,848	2,85	3
Y14-Myc RNA	2,848	3,39	543
Myc	3,358	3,387	30
Stop (TGA)	3,391	3,393	3

PTZ19R+Y14-Myc

GAATTCACCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTGCGCCAGCTGG
CGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAAATT
CGCGTTAAATTTTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGC AAAATCCCTTATAAATCAAAAGAAATAGACCGAGATAGGGTTG
AGTGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTAC
GTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTTGACGGGG
AAAGCCGGCGAACGTGGCGGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACAGCTGCGCGTAACCACC
ACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTTTTATTTTCTAAATAC
ATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGC
CCTTATTCCTTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGA
GTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGC
TATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGT
CACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGGCAACTTACTTCTGACA
ACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCA
TACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCA
ACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCC
GGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACAGCAGGGGAGTCAGGCAACTA
TGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACGTGCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGA
TTTTAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGA
GCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAAACCACCGCTACCAG
CGGTGGTTTTGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACGACAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTA
GCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAG
TCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGCGCGACGCGTGGGGTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGC
GAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG
CAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAACGCGCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGT
CGATTTTTTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGA AAAACGCCAGCAACGCGCCTTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTTGCTC
ACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCG
CAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACGCGCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTATTAAATGCAGCTGGCAGCAGAG
TTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTC
GTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGAAA
GCTTGCATGCCTGCAGGTGCACTCTAGAGGATCCATGGCAGATGTTTTGGACATCAACGATTCCGTGCAATTGGACGTGGAAGACGAAGGAGACCAG
AGCGTTTTGCGCCTGAAAGATAAAGTTGTAAAGCGGAAAGGTGCGGGCTTTGGGCCTGGAGAGACCAAGGAACATGAGAAAAATTCGAGGATATGAAA
GCATAGATTCCGGGGATCACGGAGACGAGCCTGGGCCACAGAAATCTGTGGAGGGTGGAATTTGTTTGTGACTTCGGTGATGAAGAGGCCAGTGA
GGATGATTTGAGTGAGAAGTTTTCCGAGTTTGGGGCTATCAAAAATATAAGTATCAACTTGGATCGTCGGACGGGTTTTTTGAAGGGATATGCTTTG
ATTGAATATGGGACGTACGAGGAAGCGTTTGGCGCCAGGGAGGCTTTGAATGGGTCTTTGTTGTTAGGGCAACAGTTGGAGTTGACTGGTGTGTTG
TTAAGGGGCCAAAAAGTCAAAGAAACGTGCAAGGAGACCGGTACCAAGCTTGGGCCGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATTGA

Приложение 3. Выравнивание геномной последовательности Y14 *T. castaneum*, мРНК Y14 *T. castaneum* и последовательностей полученных в результате сиквенса мРНК Y14 сплайсированной в клетках человека НЕК293.



		
	5 15 25 35 45 55 65	
Y14_Gene_N	AGTGGCACGG TTGGCAACGC TACCGCGACT TCAAACGTCA AAGAAGCATC CCAAAATTAT GCTAAAAATC	
Y14_mRNA_X	AGUGGCACGG UUGGCAACGC UACCGCGACU UCAAACGUCA AAGAAGCAUC CCAAAUUUUAU GCUAAAAAUC	
SEQClone3.	-----GT	GNCCCAAAGC
SEQClone3.	-----	-----
		
	75 85 95 105 115 125 135	
Y14_Gene_N	GGTCTTTTTT AATAAAAAAA ACGTGTGTAG TGTCGTTGT- TACAATGGCA GATGTTTTTG ACATCAACGA	
Y14_mRNA_X	GGUCUUUUUU AAUAAAAAAA ACGUGUGUAG UGUCGUUGU- UACAAUGGCA GAUGUUUUGG ACAUCAACGA	
SEQClone3.	CCTGGTGAGA CCCTTNTTCT CGGTCCGTAA TGCCTTGGGA TGTAATAAAG GATGTTTTTG ACATCAACGA	
SEQClone3.	----- TCGCCGCGAA TGCTCTAGAT TGTGCTAGC- CACCATGGCA GATGTTTTTG ACATCAACGA	
		
	145 155 165 175 185 195 205	
Y14_Gene_N	TTCCGTCGAA TTGGACGTGG AAGACGAAGG AGACCGTAGG CAAGCCGTAA CATAACCTCT CCTTTTCCTA	
Y14_mRNA_X	UUCCGUCGAA UUGGACGUGG AAGACGAAGG AGACC-----	-----
SEQClone3.	TTCCGTCGAA TTGGACGTGG AAGACGAAGG AGACCGTAGG CAAGCCATAA CATAACCTCT CCTTTTCCTA	
SEQClone3.	TTCCGTCGAA TTGGACGTGG AAGACGAAGG AGACCGTAGG CAAGCCATAA CATAACCTCT CCTTTTCCTA	
		
	215 225 235 245 255 265 275	
Y14_Gene_N	ACCTCACATT TCCAGAGAGC GTTTTGCGCC TGAAAGATAA AGTTGTAAAG CGGAAAGGTC GCGGCTTTGG	
Y14_mRNA_X	-----AGAGC GUUUUGCGCC UGAAAGAUAA AGUUGUAAAG CGGAAAGGUC GCGGUUUUGG	
SEQClone3.	ACCTCATATT TCCAGAGAGC GTTTTGCGCC TGAAAGATAA AGTTGTAAAG CGGAAAGGTC GCGGCTTTGG	
SEQClone3.	ACCTCATATT TCCAGAGAGC GTTTTGCGCC TGAAAGATAA AGTTGTAAAG CGGAAAGGTC GCGGCTTTGG	
		
	285 295 305 315 325 335 345	
Y14_Gene_N	GCCTGGAGAG ACCAAGGAAC ATGAGAAAAA TCGAGGATAT GAAAGCATAG ATTCCGGGGA TCACGGAGAC	
Y14_mRNA_X	GCCUGGAGAG ACCAAGGAAC AUGAGAAAAU UCGAGGAUUA GAAAGCAUAG AUUCCGGGGA UCACGGAGAC	
SEQClone3.	GCCTGGAGAG ACCAAGGAAC ATGAGAAAAA TCGAGGATAT GAAAGCATAG ATTCCGGGGA TCACGGAGAC	
SEQClone3.	GCCTGGAGAG ACCAAGGAAC ATGAGAAAAA TCGAGGATAT GAAAGCATAG ATTCCGGGGA TCACGGAGAC	
		
	355 365 375 385 395 405 415	
Y14_Gene_N	GAGCCTGGGC CACAGAAATG TAATTTGCAT TTAAACAGT TTTAGTGTG TAAACAGTTA TTTTGC GTTC	
Y14_mRNA_X	GAGCCUGGGC CACAGAAAU- -----	-----
SEQClone3.	GAGCCTGGGC CACAGAAAT- -----	-----
SEQClone3.	GAGCCTGGGC CACAGAAAT- -----	-----
		
	425 435 445 455 465 475 485	
Y14_Gene_N	TAGCTGTGGA GGGGTGGATT TTGTTTGTGA CTTGCGTGCA TGAAGAGGCC AGTGAGGATG ATTTGAGTGA	
Y14_mRNA_X	---CUGUGGA GGGGUGGAUU UUGUUUGUGA CUUCGGUGCA UGAAGAGGCC AGUGAGGAUG AUUUGAGUGA	
SEQClone3.	-----	-----
SEQClone3.	-----	-----
		
	495 505 515 525 535 545 555	
Y14_Gene_N	GAAGTTTTTC GAGTTTGGGG CTATCAAAAA TATAAGTATC AACTTGGATC GTCGGACGGG TTTTGTGAAG	
Y14_mRNA_X	GAAGUUUUCC GAGUUUGGGG CUAUCAAAAA UAUAAGUAUC AACUUGGAUC GUCGGACGGG UUUUUUGAAG	
SEQClone3.	-----	-----
SEQClone3.	-----	-----
		
	565 575 585 595 605 615 625	
Y14_Gene_N	GGATATGCTT TGATTGAATA TGGGACGTAC GAGGAAGCGT TTGCGGCCAG GGAGGCTTTG AATGGGTCTT	
Y14_mRNA_X	GGAUUAGCUU UGAUUGAAUA UGGGACGUAC GAGGAAGCGU UUGCGGCCAG GGAGGCUUUG AAUUGGUCUU	
SEQClone3.	-----	-----
SEQClone3.	-----	-----
		
	635 645 655 665 675 685 695	
Y14_Gene_N	TGTTGTTAGG GCAAACAGTT GGAGTTGACT GGTGTTTTGT TAAGGGGCCC AAAAAGTAAG TTTCTTGGTT	
Y14_mRNA_X	UGUUGUUAGG GCAAACAGUU GGAGUUGACU GGUGUUUUUG UAAGGGGCCC AAAAA-----	-----
SEQClone3.	-----	-----
SEQClone3.	-----	-----
		
	705 715 725 735 745 755 765	
Y14_Gene_N	TTGAATGGTT AAATCTTAGT GATTTGATTT CTTTTCAGGT CAAAGAAACG TGCAAGGAGA CACTGATTG-	
Y14_mRNA_X	-----GT	CAAAGAAACG UGCAAGGAGA CACUGAUUG-
SEQClone3.	-----GT	CAAAGAAACG TGCAAGGAGA CACTGAGCG-
SEQClone3.	-----GT	CAAAGAAACG TGCAAGGAGA CACTGAGCGG
		
	775 785 795 805 815 825 835	
Y14_Gene_N	-----TAAC GTAAATTATT TATAACTCAA TTTTCCACTT ATATCCATTA ATTTCTTAAG ATTACAAAAAG	
Y14_mRNA_X	-----UAACU GUAAAUAUUU UAUAACUCAU AUUUCACUUU AUUUCUUAAG AUUACAAAAAG	
SEQClone3.	-----GCCGC GTAATCGGAT CCCGGGCCCG TCGACTGCAG AGGCCTGCAT GCAAGCTTTA AACTATAGGA	
SEQClone3.	CCGCGTAATC GGATCCCGGG CCCGTCGACT GCAGAGGCCT GCATGCA--A GCTTCCCTA TAGTGAGTCG	
		
	845 855 865 875 885 895 905	
Y14_Gene_N	TAAGGTTCTT TGGTGTAATT TATTTATGAC ATTCAAGAAG TAATAAATTG TGAGTTTTTT ACGTG	
Y14_mRNA_X	UAAGGUUUUU UGGUGUAUUU UAUUUUAGAC AUUCAAGAAG UAAUAAUUG UGAGUUUUUU ACGUG	
SEQClone3.	TCTATAGCTG C-----	-----
SEQClone3.	TATTAGAGCT TGGCGTAATC ATGGTCATAG CTGTTTCCTG TGTGAAATTG TTATCCGTCA CAATT	

Благодарности.

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю Ольге Игоревне Подгорной, знания, энергия и упорство которой помогли состояться данной работе.

Автор выражает особую признательность научному руководителю Дмитрию Сергеевичу Боголюбову за помощь, искреннее участие и понимание.

Автор благодарит оппонентов Алсу Фаритовну Сайфитдинову и Родионова Александра Викентьевича за детальные и глубокие отзывы о работе.

Особую благодарность автор выражает Владимиру Николаевичу Парфёнову за блестящие идеи и неоценимую помощь в организации работы.

За моральную и материальную поддержку автор выражает благодарность Анне Александровне Костаревой и Анне Борисовне Малашичевой.

Автор выражает благодарность Борису Владимировичу Мурашеву, за фундаментальные и практические знания, переданные автору в ходе работы над практической частью диссертации.

Автор выражает искреннюю благодарность Ларисе Леонидовне Круковской - за методическую помощь в ходе работы над практической частью диссертации.

Автор выражает искреннюю благодарность Екатерине Борисовне Акуловой за неоценимую помощь в работе с культурой клеток НЕК293.

Автор выражает глубокую благодарность Адонину Леониду Сергеевичу, организаторские качества которого способствовали завершению данной работы.

Автор выражает глубокую признательность Андрею Петровичу Козлову, за предоставленную возможность осуществления практической части данной работы в составе его научной группы.

Автор благодарит Татьяну Федоровну Андрееву, которую автор считает образцом стойкости, силы и преданности своему делу.

Автор выражает глубокую благодарность Милане Анатольевне Кулаковой за переданные автору в ходе работы над дипломным проектом практические и фундаментальные знания.

Автор благодарит Елену Александровну Соколову за организацию работы над курсовыми и дипломными проектами.

Автор благодарит Ксению Олеговну Буйневич за поддержку, понимание и вдохновение.

Автор выражает Морозовой Нине Васильевне за интерес, привитый к биологической науке.

Особую благодарность автор выражает, Ольге Олеговне Киселёвой, за воспитание, всестороннюю помощь, и поддержку объём которых, трудно оценить.

Автор выражает глубокую благодарность и признательность своему первому научному руководителю Александру Александровичу Кутину, за переданные фундаментальные и практические знания, способствовавшие формированию научного мировоззрения и умений применять научный подход не только в работе, но и в жизни.