

ЛОКАЛИЗАЦИЯ РНК *GERMES* В ООЦИТАХ *XENOPUS*© 2021 г. М. Б. Пономарев^а, В. В. Кондукторова^{б, *}, Н. Н. Лучинская^б, А. В. Белявский^а^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Вавилова, 32, Москва, 119991 Россия^бМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

*e-mail: virgo584@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.05.2020 г.

После доработки 26.06.2020 г.

Принята к публикации 30.06.2020 г.

Идентифицированный нами ранее ген *Germes* экспрессируется в ооцитах *Xenopus*, мРНК которого ассоциируется с половой плазмой. В настоящем исследовании были охарактеризованы цис-действующие факторы, которые регулируют локализацию РНК *germes* в развивающемся ооците. Инъекция флуоресцентно меченых РНК, соответствующих различным частям последовательности мРНК *germes*, продемонстрировала, что последовательность, необходимая и достаточная для правильной локализации в митохондриальное облако ооцита ранней стадии развития, расположена в 3'НТО. Было обнаружено, что домен, богатый САС-мотивами, выявленными в дистальной части 3'НТО, является достаточным для локализации РНК. В пределах этого домена были идентифицированы один незначительный (*a*) и два необходимых (*b* и *c*) поддоменов. Было обнаружено, что 37-буквенный субдомен *c*, примыкающий к поли-А хвосту, нужен для локализации, поскольку его удаление из нескольких протестированных конструкций лишает их способности к локализации. Анализ последовательности 3'НТО показал наличие трех различных мотивов локализации РНК в ооците.

Ключевые слова: локализация РНК, элементы локализации, НТО, митохондриальное облако, РНК-связывающие белки, САС мотивы, ооциты *Xenopus*

DOI: 10.31857/S0475145021010055

ВВЕДЕНИЕ

Локализация молекул РНК в клетках является важным и широко распространенным механизмом регуляции целого ряда клеточных функций. У многих видов животных РНК, локализованные в ооците, играют решающую роль в раннем развитии, инициируя разнообразные процессы в различных областях зародыша. Такие эндогенные РНК могут концентрироваться в ооците на анимальном или вегетативном полюсе, но на вегетативном полюсе концентрирование за счет заякоривания в кортексе идет массово (King et al., 2005). Некоторые из локализованных материнских РНК сосредоточены на вегетативном полюсе в половой плазме — особой структуре, определяющей развитие первичных половых клеток у некоторых многоклеточных, включая бесхвостых амфибий. Как правило РНК участвующие в ранней разметке зародышей *Xenopus* и специализации соматических тканей локализуются на вегетативный полюс на более поздней стадии развития ооцита, чем РНК половой плазмы (Клос, Etkin, 1995). Механизм локализации РНК в превителлогенных ооцитах (стадия I) включает в себя первоначальную ассоциацию этих РНК с околоядерной структурой, называемой митохондриаль-

ным облаком (МО), и носит название раннего или METRO (Message Transport Organizer) опосредованного. В начале вителлогенеза (стадии II–III) МО приходит в контакт с вегетативным кортексом ооцита, где и закрепляются РНК и белки МО. Позже с III стадии роста ооцита и вплоть до созревания половая плазма выглядит как островки в субкортикальной области. Поздно вегетативно локализующиеся РНК используют механизм, включающий транспорт по микротрубочкам с участием кинезинов (Yisraeli et al., 1990; Betley et al., 2004; Yoon and Mowry, 2004; King et al., 2005).

Однако жесткой корреляции способа и времени локализации нет. Houston даже выделяет особый “промежуточный” путь (Houston, 2013). Для ряда РНК показана способность использовать оба эти пути. Так, РНК *wnt11*, как правило, локализуется ранним путем, но ее также обнаруживают в РНП частицах позднего пути. Другой пример — РНК половой плазмы *Xcat2/nos1*, *Xpat*, *Xlsirt*, использующие механизм METRO, могут локализоваться в островки по механизму позднего пути (Zhou, King, 1996; Hudson, Woodland, 1998; Bereckya et al., 2003). И наоборот, ключевые вегетативные РНК *Vgl* и *VegT*, локализующиеся по

позднему пути, обнаруживают в структурах половой плазмы (ПП), сформированных ранним механизмом (Nijjar, Woodland, 2013). Для РНК ПП *germes* основным путем локализации является МЕТРО, но после инъекций в ооцит на поздних стадиях обнаруживается в ПП, что говорит о возможности локализации эндогенной РНК, не попавшей в МО на ранней стадии, использовать поздний путь (Berekelya et al., 2003, 2007).

Исследования механизмов локализации различных мРНК у *Xenopus* привели к открытию множества цис-действующих элементов локализации (ЭЛ), в основном, в 3'-нетранслируемой области (НТО) последовательности РНК и транс-действующих с ними белков. Стало ясно, что единой консенсусной последовательности локализации РНК не существует. ЭЛ могут быть разной длины, как правило, около 300 п.н. (Bubunencko et al., 2002). У многих РНК были найдены одинаковые мотивы в элементах локализации, которые, как полагают, могут конкурировать за одни и те же транс-действующие белки (Houston, 2013). За последнее время накоплено немало такого рода дан-

ных, однако, ясной схемы локализации различных РНК к вегетативному полюсу ооцита по-прежнему нет.

Описанная нами ранее РНК гена *Germes* локализуется в ооцитах *Xenopus* на вегетативный полюс по раннему механизму (Berekelya et al., 2003). Целью настоящего исследования было найти необходимый и достаточный ЭЛ, охарактеризовать цис-действующие последовательности, ответственные за это. Как и для многих других локализующихся РНК, было установлены мотивы, содержащие САС элементы в 3'НТО *germes*. Попытки уменьшить размеры ЭЛ были в основном безуспешными, что указывает на то, что общая вторичная структура этого региона РНК важна для его функции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание конструкторов

В работе были использованы следующие олигонуклеотиды:

xGer-3U/Xho-S9: TCATCTCGAGTAAAGATGGTAAAGACTGAAAA;
 xGer-3U/Xho-S8: TCATCTCGAGTATTGTTGGAGTGCAGTTTTT;
 xGer-3U/Xho-S7: TCATCTCGAGTGTTTAGATGTGTCTTATATTTAG;
 xGer-3U/Sal-A6: CTGAGTCGACATAAAATATTTGAATTTATTGAGG;
 XhoI-UTR/s6: TCATCTCGAGTATCACTTTCTGCACTTTTT;
 SpeI-UTR/as5: CAACTAGTATCCAATCTTATCAAATC;
 SpeI-UTR/s5: AGACTAGTATAACTTTTGAACCAC;
 SalI-UTR/as4: CTGAGTCGACGTATTAATTAGAAGTTGTG;
 XhoI-UTR/s4: CATCCTCGAGTGCAAAATTGTCACCTTG;
 XhoI-UTR/s3: GACACTCGAGATAACTTTTGAACCACACTG;
 XhoI-UTR/s2: CAGACTCGAGAAAAAATGTATTTTCATTTG;
 UTR/as1: ACAAGCATGCACAGACTACAAATGAAATAC;
 UTR/s1: GGCTTCATGCATGCAAAATTG.

Для получения конструкций для экспрессии поддоменов 3'НТО *germes* соответствующие фрагменты кДНК амплифицировали с плазмиды, содержащей полнодлинную кДНК *germes*, с использованием следующих пар праймеров для указанных клонированных поддоменов.

c: XhoI-UTR/s4 & xGer-3U/Sal-A6
bc: XhoI-UTR/s3 & xGer-3U/Sal-A6
Lbc: XhoI-UTR/s2 & xGer-3U/Sal-A6
abc: XhoI-UTR/s6 & xGer-3U/Sal-A6
3'НТО: Ger-3U/Xho-S9 & xGer-3U/Sal-A6
a'bc: xGer-3U/Xho-S7 & xGer-3U/Sal-A6
a''bc: xGer-3U/Xho-S8 & xGer-3U/Sal-A6
abc': XhoI-UTR/s6 & SalI-UTR/as4
Lbc': XhoI-UTR/s2 & SalI-UTR/as4
bc': XhoI-UTR/s3 & SalI-UTR/as4

c': XhoI-UTR/s4 & SalI-UTR/as4.

После амплификации фрагменты обрабатывали рестриктазами XhoI и SalI, встраивали в вектор pSP73 (Promega) и после клонирования проверяли секвенированием.

Для создания конструкций с делециями основные цепи, лишённые соответствующих областей, амплифицировали из плазмиды, содержащей полную 3'НТО со следующими парами праймеров:

3'UTRΔa: SpeI-UTR/s5 & SpeI-UTR/as5

3'UTRΔb: UTR/s1 & UTR/as1.

Конструкт 3'UTRΔc был сделан из конструкта 3'НТО, путем удаления области рестриктазами SphI и SnaBI.

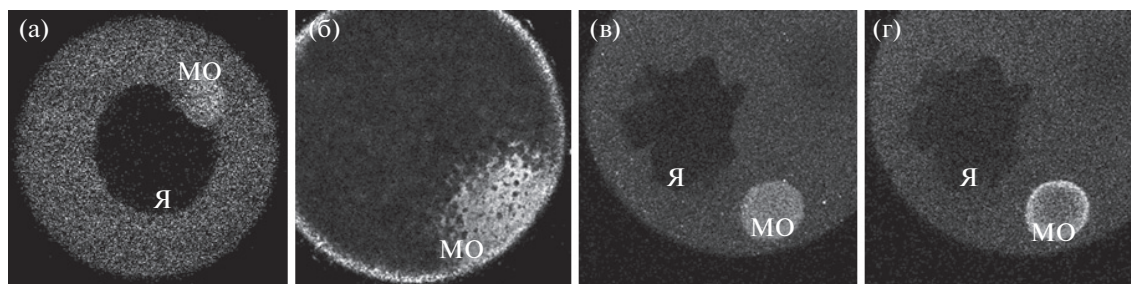


Рис. 1. 3'НТО ответственна за локализацию РНК *germes* в митохондриальное облако ооцитов. (а, б) Полноразмерная флуоресцентно меченая мРНК *germes* локализуется в ооцитах I (а) и II/III (б) стадий преимущественно в МО через 24–48 ч. (в, г) Флуоресцентно меченые 3'НТО РНК *germes* (в) и *xcat2* (г) совместно инъецированные в оцитах I/II стадии также локализуются в МО, однако *xcat2* концентрируется на его границах, в отличие от равномерно распределенного *germes*. Я — ядро, МО — митохондриальное облако.

Создание флуоресцентных РНК зондов

РНК-зонды были синтезированы с плазмид с помощью стандартных техник по протоколу производителя (mMessage mMachine, Ambion) с добавлением Alexa488-UTP или тетраметилродамин-UTP (Molecular Probes) и смеси немеченых нуклеотидов (соотношение 1 : 5). Несвязанные нуклеотиды удаляли с использованием колонок Sephadex G-50 Quick Spin (Roche).

Микроинъекции

Ооциты I/II стадии (или III/IV) (по Dumont, 1972) высвобождали из иссеченных яичников после обработки коллагеназой А (Sigma, 0.8 мг/мл в 0.1 М NaH_2PO_4 , pH 7.4) путем легкого покачивания в среде L-15: 50% среда Leibowitz (Sigma) с добавлением 1 мг/мл BSA, 100 мкг/мл гентамицина, 1 ед./мл пенициллина и 1 мкг/мл стрептомицина. Затем ооциты промывали трижды и переносили в свежую среду. Микроинъекции в объеме 30–100 пл (в концентрации 1 мг/мл) проводили с помощью аппарата Eppendorf Femtojet. После инъекций ооциты переносили в свежую среду L-15, но без БСА с добавлением 1 мМ L-глутамина, 1 мкг/мл инсулина, 15 мМ Hepes (pH 7.8), 50 ед./мл нистатина и 5–10% сыворотки *Xenopus*, содержащей вителлогенин (Opresko, 1991). Культивирование проводили в темноте при 18°C в герметичных камерах, состоящих из двух стеклянных покровных стекол, разделенных прокладкой из увлажненной фильтровальной бумаги (Zhou, King, 1996).

Конфокальная микроскопия ооцитов

Для визуализации эндоплазматического ретикула в ооциты инъецировали 30 пл насыщенного DiI C16 в растительном масле Wesson (Terasaki, Jaffe, 1991). Изображения были получены через 3–30 ч после введения РНК. Для исследований мутаций две РНК, синтезированные в присутствии различных флуоресцентных меток (Alexa488 и Те-

tramethylrhodamine), смешивали в равном молярном соотношении и инъецировали в ооциты. После инкубации в течение 24–48 ч ооциты исследовали на инвертированном конфокальном микроскопе Leica SP2 с использованием программного обеспечения Leica и ImageJ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

*РНК *germes* локализуется в митохондриальное облако с помощью 3'НТО*

Для определения цис-последовательности, ответственной за локализацию РНК *germes*, флуоресцентно меченые синтетические РНК или РНК участков регионов *germes* инъецировали в ранние ооциты (ст. I–II/III), а затем исследовали их распределение с помощью конфокальной микроскопии. Через 24–48 часов после инъекции полноразмерная РНК *germes* локализовалась в МО ооцитов, что соответствует раннему механизму локализации (рис. 1а, 1б). Кроме того, было показано, что как полноразмерная РНК *germes*, так и 3'НТО РНК колокализуются в МО с совместно инъецированной 3'НТО РНК *xcat2* (*nanos homolog 1*) (рис. 1в, 1г), в отличие от РНК открытой рамки считывания (ORF) *germes*, которая оставалась равномерно распределенной в цитоплазме (данные не приводятся). Был сделан вывод, что за правильную локализацию РНК *germes* в ооците необходимой и достаточной является 3'НТО, где должны содержаться цис-действующие элементы локализации.

Удалось показать, что инъецированные флуоресцентные РНК *xcat2* и *germes* по-разному распределяются внутри МО: РНК *germes* — равномерно, а РНК *Xcat2* концентрируется на границах МО (рис. 1в–1г). Локализация других мРНК в разных компартментах МО отмечалась и ранее при исследовании локализации методом электронной микроскопии (Kloc et al., 2002).

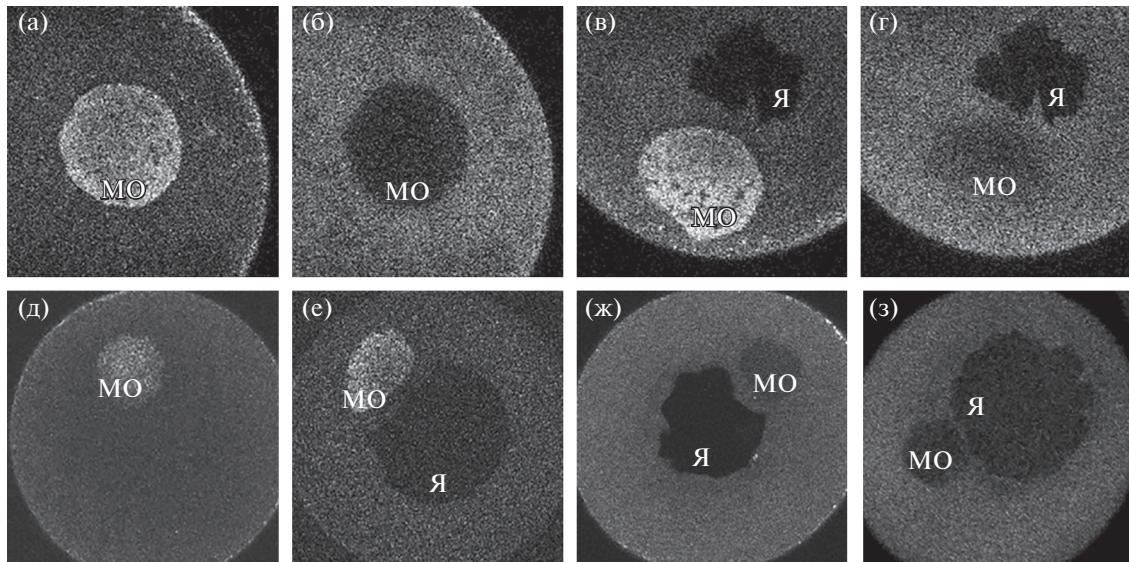


Рис. 2. Локализация РНК поддоменов 3'НТО *germes*. (а–г) РНК 3'НТО с делецией поддомена *b* (б) и с делецией поддомена *c* (г) не локализуются в МО в отличие от совместно инъецированной полной 3'НТО в качестве положительного контроля (а и в соответственно). (д–е) РНК поддоменов *bc* и *Lbc* локализуется в МО. (ж–з) РНК поддоменов *c* и *Lbc'* исключаются из митохондриального облака. Я – ядро, МО – митохондриальное облако.

САС-богатый регион 3'НТО РНК *germes* необходим для локализации

Для идентификации области мРНК *germes*, возможно вовлеченной в локализацию, полно-размерная последовательность была проанализирована с помощью программы REPFIND (Betley et al., 2002). Протяженный домен, богатый САС-мотивами, был обнаружен в 3'-концевой области 3'НТО РНК *germes* (рис. 3а). Первоначально, мы подразделили его на три условных поддомена, которые были обозначены как *a*, *b* и *c* (рис. 3б).

Инъекция родамин-меченой РНК 3'НТО, в которой отсутствуют области *a*, *b* или *c*, совместно с Alexa-488-меченой РНК 3'НТО (в качестве положительного контроля) в ооциты I/II стадии показала, что РНК, лишенные областей *b* или *c*, были полностью или частично исключены из МО, в отличие от полноразмерной РНК 3'НТО (рис. 2а–2г). Удаление области *a* не препятствовало локализации РНК в МО (не показано). Можно сделать вывод, что дистальные САС повторы поддоменов *b* и *c* необходимы для правильной локализации РНК *germes*, тогда как поддомен *a* не является обязательным, хотя и влияет на процесс.

С помощью алгоритма MFOLD (Mathews et al., 1999; Zuker, 2003) была предсказана вторичная структура 3'НТО последовательности *Germes*, в частности САС-богатой области. С высокой вероятностью можно предположить, что последовательность формирует компактные вторичные структуры на протяжении всей длины 3'НТО (рис. 4). Области *a* и *b* (фрагменты 1–4, рис. 4) вместе формируют совместную двухцепочечную струк-

туру с петлями и группой шпилек, полностью сформированной поддоменом *a* (участок 1–2, рис. 4). Оставшаяся часть поддомена *a*, обозначенная как *L* (участок 2–3, рис. 4), образует спираль с петлями совместно с *b*. Регион *c* отмечен на рис. 4, участок 4–6, большая его часть формирует две автономные спирали с петлями, который мы условно назвали *c'* (участок 4–5 на рис. 4).

Основываясь на анализе вторичной структуры, были синтезированы и проверены в отношении их способности к локализации в ооцитах различные фрагменты последовательности РНК, представленные на рис. 5. Флуоресцентные РНК, соответствующие этим последовательностям, инъецировали в ооциты I/II стадии. Последовательность *abc* локализуется в МО как и совместно вводимая полная последовательность 3'НТО в качестве положительного контроля. РНК с фрагментов *a*, *b*, *c*, *c'*, *abc'*, *Lb* и *Lbc'* не локализовались в МО (рис. 2б, 2ж, 2з). РНК *abc'*-конструкции отличается от *abc* отсутствием дистальных 37 п.н., что указывает на важность этой короткой 3'-концевой последовательности (участок 5–6 на рис. 4). Этот результат был также подтвержден аналогичными сравнениями между областями *bc* (рис. 2д) и *bc'* (не показаны) и областями *Lbc* и *Lbc'* (рис. 2е, 2з). В каждом случае удаление 3'-конца приводило к нарушению локализации РНК конструкта. Таким образом, минимальной последовательностью, поддерживающей локализацию, является область *bc*, хотя она окрашивает МО не типично. Следующий по размеру конструкт *Lbc* локализуется неотличимо от контрольной 3'НТО.

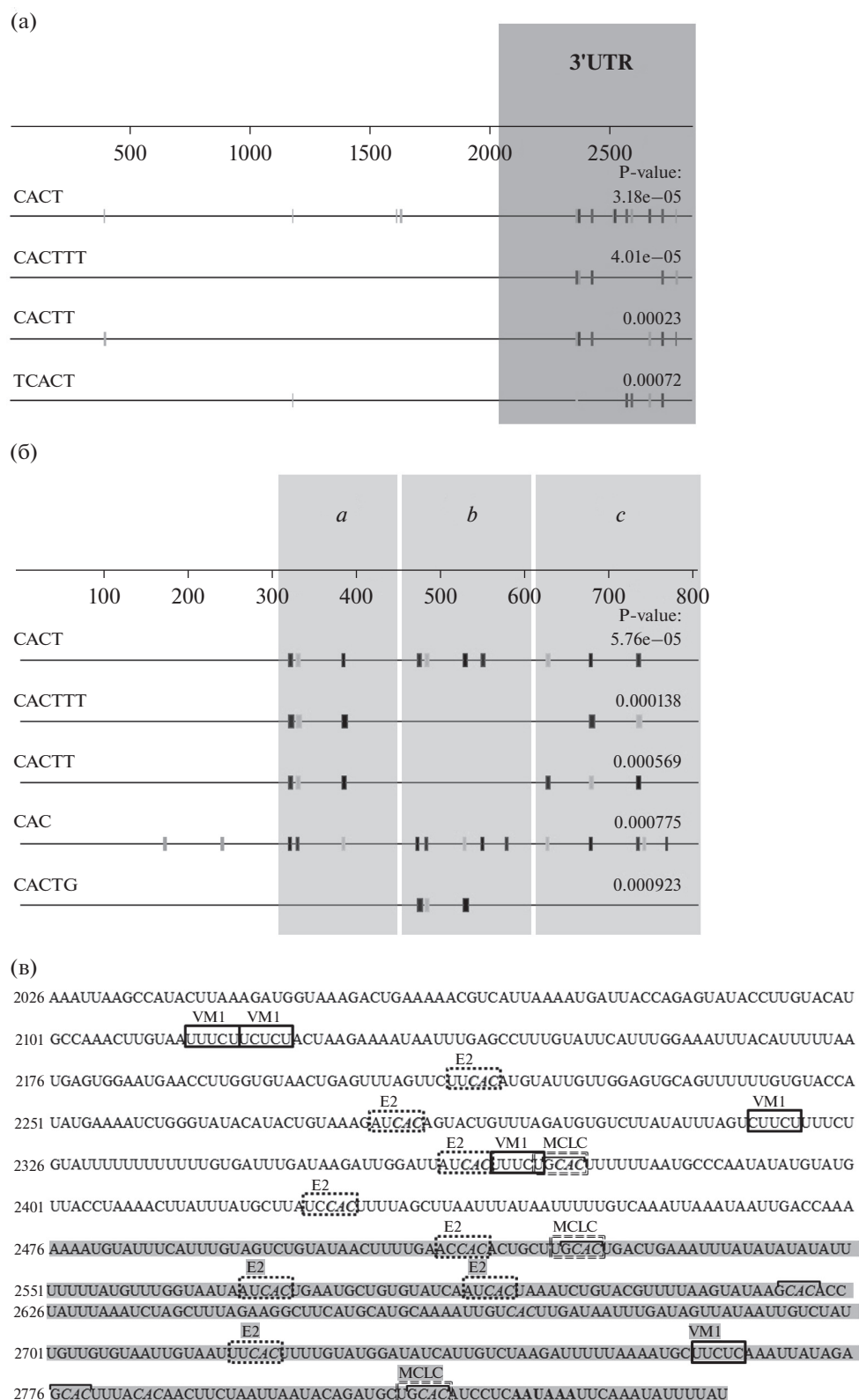


Рис. 3. Анализ РНК *germes* с использованием программного обеспечения REPFIND. (а) Показаны CAC-содержащие повторы с наименьшими значениями Р (изображены штрихами на последовательности). 3'НТО выделена серым цветом. (б) Домен, богатый CAC-повторами, разделен на три поддомена, *a*, *b* и *c*. Показаны CAC-содержащие повторы с самыми низкими значениями Р. (в) Последовательность 3'НТО *germes*. Нумерация соответствует полноразмерной РНК *germes*. Минимальная локализуемая область *bc* выделена серым цветом. CAC мотивы выделены курсивом с тенью. 3'-терминальная 37 п.н. область, критическая для локализации, подчеркнута. Сайт полиаденилирования показан жирным шрифтом. Отмечена повторность GCAC. Выделены мотивы VM1, E2 и MCLC.

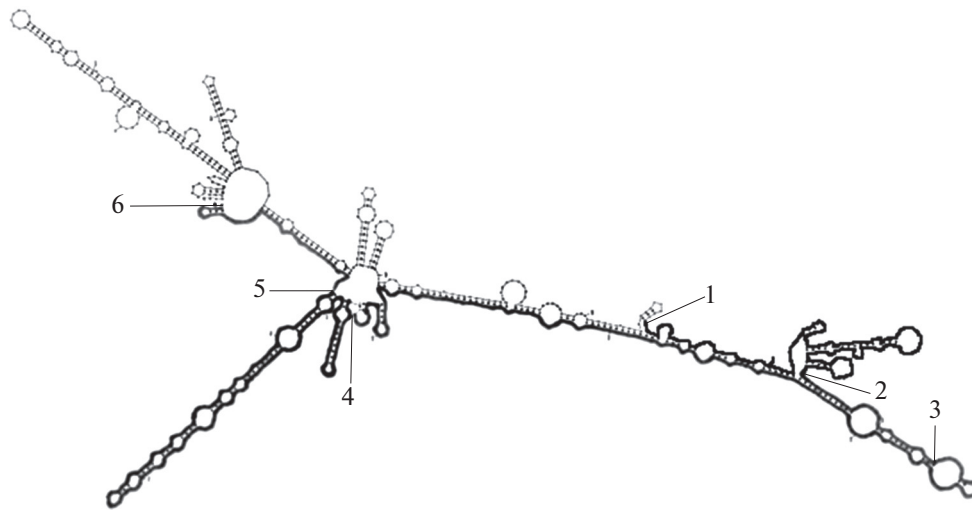


Рис. 4. Вторичная структура 3'НТО РНК *germes* с наименьшим значением P , полученная с использованием алгоритма MFOLD. Фрагмент 1–3 соответствует поддомену *a*, фрагмент 3–4 – поддомену *b*, фрагмент 4–6 – поддомену *c*, 2–4 соответствует области *Lb*, 4–5 – области *c'*.

ОБСУЖДЕНИЕ

В этом исследовании мы показали, что 3'НТО РНК *germes* является необходимой и достаточной для ее правильной локализации в ооцитах по раннему пути. Была изучена роль различных регионов РНК 3'НТО *germes* в локализации. Хотя более детальный анализ делеций проведен не был, похоже, что минимальная последовательность, необходимая для локализации, не может быть меньше, чем область *bc*. Картина локализации в МО *bc* уже выглядит атипично. Усеченные на 5' или 3' конце производные области *bc* конструкции *c* и *bc'* теряли способность к локализации. Таким образом, ЭЛ РНК *germes* может быть определена как последовательность из 300 п.н., сходная с элементами локализации, определенными для ранней *xcat2* (240 п.н.) и поздних локализующихся РНК *Vg1* (340 п.н.) и *VegT* (300 п.н.) (Bubunencko et al., 2002).

Какие особенности РНК *germes* определяют ее поведение локализации в ооцитах? Мы не нашли четких доказательств критической роли вторичной структуры РНК. Конструкция *bc*, которая в соответствии с предсказаниями MFOLD не способна имитировать свертывание полной 3'НТО, локализовалась почти так же, как и полноразмерная 3'НТО и более длинные конструкции. Кроме того, было продемонстрировано, что наиболее дистальная 3'-концевая область фрагмента *c*, которая, как ожидалось, не участвует в компактном сворачивании областей *bc* или *Lbc*, является важной для локализации. Исследования других ЭЛ известных РНК в ооцитах *Xenopus* также не выявили важности вторичной структуры РНК в локализации, исключение составляет РНК *Xlsirt* (Allen et al., 2003). Отсутствие корреляции между

предсказанной вторичной структурой РНК и ее поведением может отражать как недостатки алгоритма MFOLD, так и то, что вторичная структура РНК меняется при взаимодействии с белками.

Какова бы ни была роль вторичной структуры, САС мотивы остаются существенными для локализации. В 3'НТО *germes* обнаружено 15 повторов САС, тогда как в РНК их всего 6 (рис. 3а). Количество САС мотивов само по себе не является достаточным для локализации РНК. В частности, область *abc'* содержит больше количество мотивов САС, чем область *bc*, но только последняя продемонстрировала способность правильно локализоваться. Потеря одного мотива САС в критической 3' области домена *c* (подчеркнута на рис. 3в) не компенсировалась добавлением домена *a*, содержащего три мотива САС.

Для других РНК также известны мотивы локализации, содержащие САС повторы, например мотив UGCAC локализации в митохондриальное облако (MCLS). Он был найден в нетранслируемой области РНК *xcat2/nos1*, отвечающей за локализацию в МО (Zhou, King, 1996; Chang et al., 2004). Однако для РНК *xpat* показано, что кластеризованные повторы UGCAC необходимы, но не достаточны для локализации в МО (Betley et al., 2002). В 3'НТО РНК *germes* обнаружено три мотива MCLS (UGCAC), два из которых располагаются в области *bc*, ответственной за локализацию.

Среди мотивов САС, обнаруженных в 3'НТО *germes*, найдены 8 последовательностей UUCAC, AUCAC, ACCAC и UCCAC. Показано, что они участвуют во взаимодействии с белком Vg1RBP/Vera/Igf2bp3 и получили название E2 (WYCAC) (Betley et al., 2002; Kwon et al., 2002). Необходимо

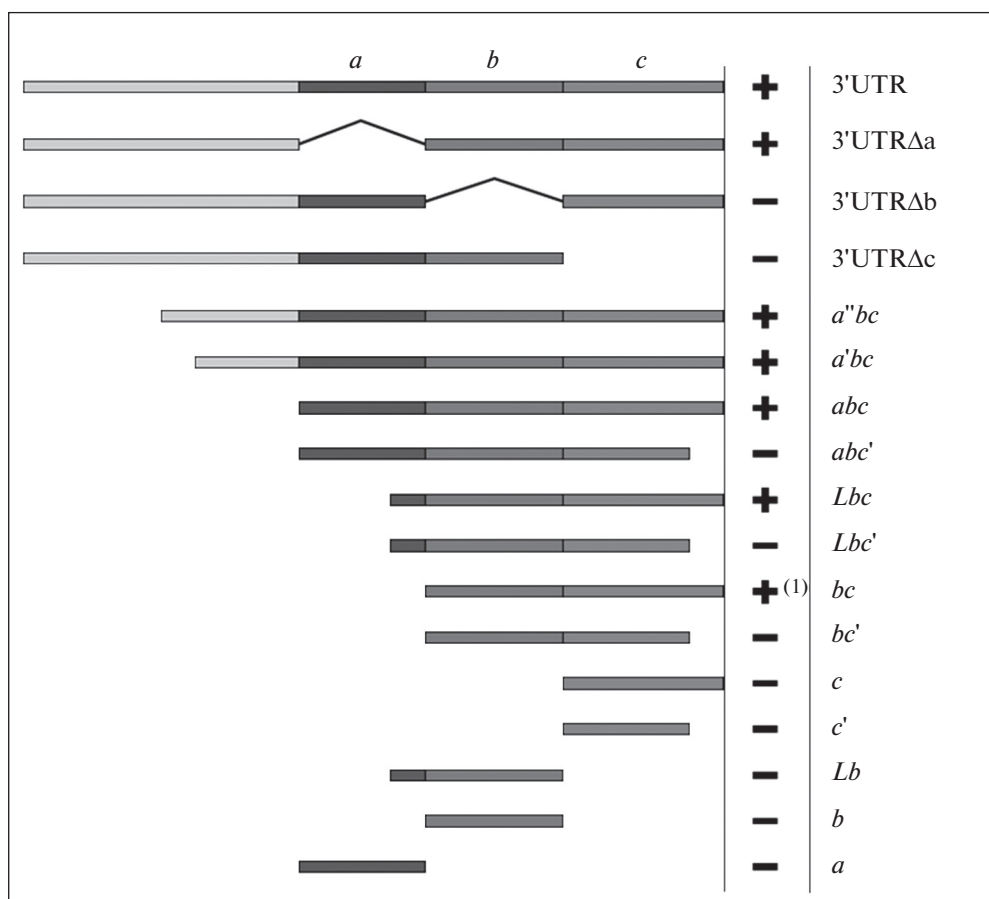


Рис. 5. Схема исследованных РНК-конструктов и их способность локализоваться в МО ооцитов. (1) – РНК *bc* поддана показывает атипичную картину локализации.

заметить, что локализация многих РНК в ооцитах многих видов хордовых сопряжена с наличием E2 (UUCAC) мотива и взаимодействием с белком Vg1RBP/Vera/Igf2bp3 (Betley et al., 2002).

В РНК *germes* имеется также цис-действующая последовательность мотива, названного VM1(YUUCU): UUUCU, CUUCU, UCUCU. Последовательность связывает белок hnRNPI/VgRBP60/Ptbp1 (Cote et al., 1999; Lewis et al., 2004). В двух работах было продемонстрировано, что кластеризация сайтов связывания белков Vg1RBP/Vera/Igf2bp3 и hnRNPI/VgRBP60/Ptbp1 имеет решающее значение для локализации РНК *Vg1* и *VegT* по позднему пути (Bubunencko et al., 2002; Snedden et al., 2013). Интересно, мотивы E2 и VM1 важны для локализации как к вегетативному, так и анимальному полюсу, как это показано для *PHAX* РНК (Snedden et al., 2013). В РНК *germes* сайты E2 и VM1 также кластеризованы, однако находятся вне зоны *bc*, ответственной за локализацию.

Choo с соавторами продемонстрировали, что ранние и поздние пути локализации РНК ис-

пользуют общие клеточные механизмы. Мотивы MCLC (UGCAC), E2 (UUCAC) важны для локализации РНК как ранним, так и поздним путем (Choo et al., 2005). РНК *germes* также содержит мотивы ранней и поздней локализации. Именно они, по видимому, обеспечивают локализацию на вегетативный полюс после инъекции РНК в ооциты стадии III–IV по позднему механизму. Возможно, этот путь используется и эндогенной РНК *germes*. На стадии II–III не вся РНК сконцентрирована в МО и транспортируется по раннему пути, существенная часть РНК остается распределенной по объему ооцита. Можно предположить, что эта РНК использует поздний механизм для локализации в половую плазму вегетативного полюса.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Evelyn Houliston (Sorbonne Université, Paris) за неоценимую методическую помощь в подготовке и проведении экспериментов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках госНИР № 30-2-16 МГУ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования все манипуляции, проводившиеся с экспериментальными животными, методы обезболивания и эвтаназии соответствовали международным нормам по биоэтике.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ: Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы А.В. Белявский и М.Б. Пономарев — планирование экспериментов, авторы М.Б. Пономарев и В.В. Кондукторова — создание конструкторов. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и подготовке публикации. М.Б. Пономарев, В.В. Кондукторова внесли одинаковый вклад в данное исследование и подготовку статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Allen L., Kloc M., Etkin L.D. Identification and characterization of the Xlsirt cis-acting RNA localization element // *Differentiation*. 2003. V. 71. P. 311–321.
- Berekelya L.A., Ponomarev M.B., Luchinskaya N.N. et al. *Xenopus Germes* encodes a novel germ plasm-associated transcript // *Gene Expr. Patterns*. 2003. V. 3. P. 521–524.
- Berekelya L.A., Mikryukov A.A., Luchinskaya N.N. et al. The protein encoded by the germ plasm RNA *Germes* associates with dynein light chains and functions in *Xenopus* germline development // *Differentiation*. 2007. V. 75(6). P. 546–558.
- Betley J.N., Frith M.C., Graber J.H. et al. A ubiquitous and conserved signal for RNA localization in chordates // *Curr. Biol*. 2002. V. 12. P. 1756–1761.
- Betley J.N., Heinrich B., Vernos I. et al. Kinesin II mediates *Vg1* mRNA transport in *Xenopus* oocytes // *Curr. Biol*. 2004. V. 14. P. 219–224.
- Bubunencko M., Kress T.L., Vempati U.D. et al. A consensus RNA signal that directs germ layer determinants to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes // *Dev. Biol*. 2002. V. 248. P. 82–92.
- Cote A. C., Gautreau D., Denegre J. et al. A *Xenopus* protein related to hnRNP I has a role in cytoplasmic RNA localization // *Mol Cell*. 1999. V. 4(3). P. 431–437.
- Chang P., Torres J., Lewis R.A. et al. Localization of RNAs to the mitochondrial cloud in *Xenopus* oocytes through entrapment and association with endoplasmic reticulum // *Mol. Biol. Cell*. 2004. V. 15. P. 4669–4681.
- Choo S., Heinrich B., Betley J.N. et al. Evidence for common machinery utilized by the early and late RNA localization pathways in *Xenopus* oocytes // *Dev. Biol*. 2005. V. 278. P. 103–117.
- Dumont J.N. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals // *J. Morphol*. 1972. V. 136. P. 153–179.
- Hudson C., Woodland H.R. *Xpat*, a gene expressed specifically in germ plasm and primordial germ cells of *Xenopus laevis* // *Mech. Dev*. 1998. V. 73. P. 159–168.
- Houston D.W. Regulation of cell polarity and RNA localization in vertebrate oocytes // *Int. Rev. Cell. Mol. Biol*. 2013. V. 306. P. 127–185.
- King M.L., Messitt T.J., Mowry K.L. Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte // *Biol. Cell*. 2005. V. 97. P. 19–33.
- Kloc M., Etkin L.D. Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes // *Development*. 1995 V. 121. P. 287–297.
- Kloc M., Dougherty M.T., Bilinski S. et al. Three-dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution within germinal granules of *Xenopus* // *Dev. Biol*. 2002. V. 241. P. 79–93.
- Kwon S., Abramson T., Munro T.P. et al. UUCAC- and Vera-dependent localization of *VegT* RNA in *Xenopus* oocytes // *Curr. Biol*. 2002. V. 12. P. 558–564.
- Lewis R.A., Kress T.L., Cote C.A. et al. Conserved and clustered RNA recognition sequences are a critical feature of signals directing RNA localization in *Xenopus* oocytes // *Mech. Dev*. 2004. V. 121. P. 101–109.
- Mathews D.H., Sabina J., Zuker M. et al. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure // *J. Mol. Biol*. 1999. V. 288. P. 911–940.
- Nijjar S., Woodland H.R. Localisation of RNAs into the germ plasm of vitellogenic *Xenopus* Oocytes // *PLoS ONE*. 2013. V. 8(4). e61847.
- Opresko L.K. Vitellogenin Uptake and in Vitro Culture of Oocytes // *Methods Cell Biol*. 1991. V. 36. P. 117–132.
- Snedden D.D., Bertke M.M., Vernon D. et al. RNA localization in *Xenopus* oocytes uses a core group of trans-acting factors irrespective of destination // *RNA*. 2013. V. 19. P. 889–895.
- Terasaki M., Jaffe L.A. Organization of the sea urchin egg endoplasmic reticulum and its reorganization at fertilization // *J. Cell Biol*. 1991. V. 114. P. 929–940.
- Yisraeli J.K., Sokol S., Melton D.A. A two-step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of *Vg1* mRNA // *Development*. 1990. V. 108. P. 289–298.
- Yoon Y.J., Mowry K.L. *Xenopus* Staufen is a component of a ribonucleoprotein complex containing *Vg1* RNA and kinesin // *Development*. 2004. V. 131. P. 3035–3045.
- Zhou Y., King M.L. RNA transport to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes // *Dev. Biol*. 1996. V. 179. P. 173–183.
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // *Nucleic Acids Res*. 2003. V. 31. P. 3406–3415.

Localization of *Germes* RNA in *Xenopus* Oocytes

M. V. Ponomarev¹, V. V. Konduktorova^{2, *}, N. N. Luchinskaya², and A. V. Belyavsky¹

¹*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

²*Department of Embryology, Faculty of Biology, Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: virgo584@yandex.ru*

We have previously identified a *Xenopus* maternally expressed gene *Germes*, whose mRNA associates with germ plasm. In the present study, we have characterized the cis- and trans-acting factors which regulate the localization of *Germes* RNA within the developing oocyte. Injection of fluorescently labeled RNAs corresponding to various parts of the *Germes* message demonstrated that the sequence information necessary and sufficient for correct localization in the mitochondrial cloud region of the early oocyte is located in the 3' UTR. A domain rich in CAC motifs identified in the distal part of the 3' UTR was found to be sufficient to mediate RNA localization. Within this domain, one non-essential (*a*) and two essential (*b* and *c*) subdomains were identified. A 37-base region of the *c* subdomain adjacent to the poly(A) tail was found to be important for localization since its removal from several tested constructs abolished their localization capacity. Analysis of the 3' UTR sequence showed the presence of three different motives for RNA localization in the oocyte.

Keywords: RNA localization, localization elements, UTR, mitochondrial cloud, RNA-binding proteins, CAC motifs, *Xenopus* oocytes