



Биополимеры и регуляция генома

УДК 591.392

УСИЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ЗАРОДЫШЕЙ КОСТИСТЫХ РЫБ ПОСЛЕ МИКРОИНЪЕКЦИИ нмРНК

В. П. Корж, Т. А. Буракова, А. Л. Мазин, А. А. Нейфах

Введение. Функции низкомолекулярных РНК (нмРНК) исследованы до сих пор недостаточно. В обзорах по нмРНК упоминается ряд внутриклеточных процессов, которые протекают с участием нмРНК [1, 2], однако надежные доказательства известны в единичных случаях. В частности установлено, что нмРНК участвуют в терминации трансляции секретируемых белков [3]. Появление нескольких гипотез, описывающих участие нмРНК в сплайсинге высокомолекулярных РНК [4—8], сыграли иницирующую роль в повышении интереса к исследованию нмРНК. Недавно были получены первые доказательства в пользу этих гипотез [9, 10].

Значительный интерес привлекает возможность участия низкомолекулярных РНК в регуляции транскрипции. При использовании системы изолированных ядер наблюдают в основном ингибирующий эффект нмРНК или же его отсутствие [11—13], а в живых клетках нмРНК стимулируют транскрипцию [14, 15]. При этом активные фракции нмРНК, выявленные в опытах, способны стимулировать транскрипцию и в системе изолированных ядер [16].

Ранее нами было показано, что после инъекции в оплодотворенные яйцеклетки вьюна 0,35 М NaCl экстракта ядер, полученного из зародышей вьюна на стадии гастрюлы, включенные меченые предшественники в РНК после активации транскрипции возрастает [17]. Далее мы показали, что фракция нмРНК обладает стимулирующим транскрипцию действием. Предварительное сообщение о результатах этой работы было опубликовано ранее [18].

В данной работе мы описали эффект усиления синтеза основных макромолекул клетки на ранних стадиях развития зародышей костистых рыб — вьюна (*Misgurnus fossilis* L.) и форели (*Salmo gairdnerii*) вследствие введения нмРНК, исследовали распределение инъецированных нмРНК между клеточными компартментами, связь распределения нмРНК с внутриклеточным перемещением негистоновых белков (НГБ). Появление в клетках зародыша гомо- и гетерологичных нмРНК приводит к значительному усилению включения радиоактивных предшественников в макромолекулы клетки (ДНК, РНК и белок). Инъецированные нмРНК накапливаются в ядрах клеток зародыша и это координирует с переходом НГБ из цитоплазмы в ядра клеток.

Материалы и методы. Уридин-5-³H (1,03 ТБк/мМ=28 Ки/мМ); тимидин-2-¹⁴C (2,0 ГБк/мМ=55,2 мКи/мМ); Д, Л-лейцин-2-³H (0,32 ТБк/мМ=8,7 Ки/мМ); Д, Л-триптофан-¹⁴C (0,25 ГБк/мМ=7,1 мКи/мМ); Л-триптофан-³H₂ (1,65 ТБк/мМ=45 Ки/мМ) — фирмы «Изотоп», СССР; агароза («Sigma», США); протейназа К («Boehringer», ФРГ); сефароза 4В («Pharmacia», Швеция); диэтилпирикарбонат («Koch-

Light», Англия); стекловолоконные фильтры GF/A («Whatman», Англия). Остальные реактивы марки «хч». Зрелые яйца вьюна получали с октября по июнь по принятому методу [19], используя стимуляцию хорионическим гонадотропином человека. Зрелые яйца форели получали на рыбзаводе (г. Конаково Калининской обл.) в декабре 1983 г.

Выделение нмРНК. Экстракт ядер в 0,35 М NaCl получали, как описано ранее [17]. Из экстракта методом фенольной депротеинизации с предварительной обработкой протеиназой К выделяли нуклеиновые кислоты, которые разделяли электрофоретически в горизонтальном блоке агарозы в трис-ацетатном буфере (рН 7,0). Поскольку в этих условиях ДНК остается на старте, обработку ДНКазой не производили. В некоторых случаях экстракт предварительно очищали от ДНК на колонке сефарозы 4В, как описано ранее [17]. После электрофореза из геля выделяли участки, содержащие отдельные фракции, замораживали их при -20°C и затем выдавливали буфер, который содержит нмРНК. РНК осаждали этанолом, осадок растворяли в буфере для микроинъекций (0,1 М трис-HCl, рН 7,3). Все растворы для выделения, очистки и микроинъекции РНК обрабатывали ингибитором РНКаз диэтилпирикарбонатом. Выделение нмРНК лягушки, таракана и млекопитающих (опухоль Кребса) проводили методом термической фенольной депротеинизации при 65°C с последующей очисткой электрофорезом. Меченые нмРНК получали, культивируя зародыши вьюна на стадии ранней-средней гаструлы в среде, которая содержала ^3H -уридин (50 мКи/мл) в течение 16—18 ч при 21°C . Дальнейшее выделение нмРНК вьюна проводили, как указано выше.

Мечение НГБ яйцеклеток вьюна. НГБ вьюна метили, инъецируя ^3H -триптофан с хорионическим гонадотропином по 0,5 мКи каждой самке. В развивающихся зародышах ^3H метятся в основном фракции НГБ, синтезированные в оогенезе. Для изучения фракций, синтезированных в раннем эмбриогенезе, в составе которых будет метиться в основном фракция короткоживущих ПГБ, бластодермы вьюна инкубировали в двойном растворе Гольфретсера с ^{14}C -триптофаном (20—50 мКи/мл) в течение 1 ч. Затем клетки разрушали и отделяли ядра от бластодермы центрифугированием в градиенте сахарозы.

Микроинъекции нмРНК в яйцеклетки вьюна. Проводили по известному методу [20]. Через 0,5—1,5 и 8—10 ч после оплодотворения яйцеклетки группами помещали на предметное стекло и, удалив воду, с помощью стеклянной микропипетки в каждое яйцо вводили по 20 нл раствора нмРНК. В качестве контроля использовали яйцеклетки, которым вводили равный объем буфера для микроинъекций. Инкубацию зародышей производили при 16°C . Микроинъекции эмбрионов форели проводили, помещая оплодотворенные яйцеклетки через 3—4 ч после оплодотворения в культуральные чашки Петри (Д=50 мм) по 6—8 штук. Зародыш плотно фиксировали браншами хирургического пинцета и инъецировали 100 нл раствора нмРНК в центр желтка. Яйцевые оболочки зародышей форели непрозрачны, и наблюдать за продвижением микропипетки практически невозможно, но поскольку зародыши достаточно велики, точность инъекции обеспечена. Экзоваты не образуются. Зародыши хорошо переносят инъекцию, и не менее 90 % оперированных зародышей выживали в течение всего опыта. Зародышей форели инкубировали при 11°C .

Инкубация зародышей с радиоактивными предшественниками и определение радиоактивности. Эмбрионы вьюна на нужной стадии развития освобождали от оболочек 1 %-ным раствором трипсина и, отделив от желтка, инкубировали с мечеными предшественниками (^3H -уридин, ^{14}C -тимидин, ^3H -лейцин, 50 мКи/мл) в течение 1 ч. Инкубацию останавливали, добавляя ТХУ до 10 %. Радиоактивность измеряли, нанося аликвоты гомогенатов на стекловолоконные фильтры GF/A, в толуольном сцинтиллаторе и выражали результаты в имп/мин/ A_{260} или имп/мин/зародыш, сравнивая опыт с контролем. Эмбрионы форели освобождали от яйцевых оболочек хирургически. Инкубацию и измерение радиоактивности производили, как указано выше.

Результаты. Влияние нмРНК на биосинтез макромолекул. Введение нмРНК в оплодотворенные яйцеклетки вьюна приводит к усилению включения радиоактивных предшественников основных классов макромолекул клетки (ДНК, РНК, белка). Этот эффект проявляется только после того, как произошла активация транскрипции (рис. 1). Усиление включения ^{14}C -тимидина (в 2,0—3,0 раза) ограничено периодом бластулы (6—10 ч развития) и снижается до уровня контроля с переходом зародышей к гаструляции. Повышенное включение

³H-уридина наблюдается дольше (6—20 ч, бластула—гаструла), достигает максимума на 7-м часу развития (в четыре раза выше, чем в контроле) и снижается до уровня контроля к началу органогенеза. Введение нмРНК усиливает уже начавшуюся транскрипцию, а не сдвигает ее начало. Увеличение включения ³H-лейцина заметно уже на стадии 7—8 ч развития с максимумом на стадии 20 ч развития (конец гастролы), после чего включение уменьшается. Форма соответствующей кривой наводит на мысль о том, что увеличение включения в белок является следствием усиления транскрипции.

Результаты опытов по инъекции нмРНК в зародыши форели представлены в таблице. В данном случае происходит увеличение включе-

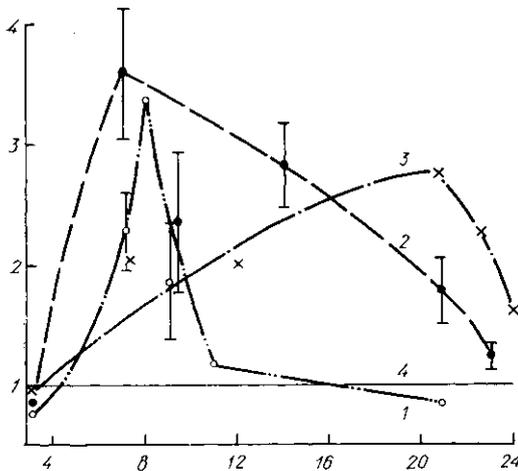


Рис. 1. Динамика включения радиоактивных предшественников в макромолекулы развивающихся зародышей вьюна после инъекции нмРНК: 1 — включение в ДНК (¹⁴С-тимидин); 2 — включение в РНК (³Н-уридин); 3 — включение в белок (³Н-лейцин); 4 — контроль. По оси абсцисс — время развития зародыша, ч; по оси ординат — включение предшественников (имп/мин/А₂₆₀) в опыте относительно контроля.

Fig. 1. Dynamics of radiolabelled precursor incorporation into macromolecules of loach embryos after snRNA injection: (¹⁴C) thymidine incorporation into DNA (1); (³H) uridine incorporation into RNA (2); (³H) leucine incorporation into protein (3); control (4).

ния радиоактивных предшественников: ³H-уридина в 1,6—2,0 раза, ³H-лейцина примерно в 4,0 раза. Повышение включения происходит на тех же стадиях развития, что и у вьюна: максимум включения в РНК наблюдали после активации транскрипции, снижение — с переходом к органогенезу. Увеличение включения в белок закономерно отстает от усиления включения в РНК. В этих опытах использовали чужеродные нмРНК (из лягушки и таракана).

Чужеродные нмРНК после микроинъекции в развивающиеся эмбрионы вьюна обладают тем же эффектом (рис. 2). В этом случае усиление включения в РНК не столь выражено, как при инъекции гомологичных РНК. Дополнительная инъекция нмРНК на стадии

Увеличение включения радиоактивных предшественников в ТХУ-нерастворимую фракцию после инъекции нмРНК в развивающиеся зародыши форели

Enhancement of the Incorporation of Radiolabelled Precursors into TCA-Precipitated Fraction after snRNA Injection into Developing Trout Embryos

нмРНК	Время развития, сут					
	3 (9-я стадия—перед морфогенетической функцией)		5 (12-я стадия—начало формирования осевых структур)		7 (14-я стадия—10 пар сомитов)	
	³ H-уридин	³ H-лейцин	³ H-уридин	³ H-лейцин	³ H-уридин	³ H-лейцин
О*/К**	О/К	О/К	О/К	О/К	О/К	
Опыт 1						
таракана	4,25	—	—	—	—	—
лягушки	0,88	—	—	—	—	—
Опыт 2						
таракана	1,40	0,74	1,94	3,24	0,65	0,84
лягушки	0,92	1,22	1,60	1,44	1,58	3,82

* О — опыт; ** К — контроль.

8—10 ч (поздняя бластула — ранняя гастрюла) не вызывает дальнейшего увеличения включения предшественников.

Введение нмРНК приводит к перемещению НГБ в ядра клеток. Изучая транспорт НГБ в клетках после инъекции нмРНК, мы оценивали поведение двух фракций НГБ: 1 — НГБ, синтезированных по мере созревания яйцеклетки (^3H -триптофан вводили с гонадотропином), которые вследствие длительности эксперимента (48—60 ч) были представлены в основном долгоживущими белками; 2 — новосинтезированных белков, которые метились и переносились в ядра в течение 1 ч и поэтому были представлены в основном короткоживущими белками (рис. 3, А). Анализ кривых, которые отражают соотношение

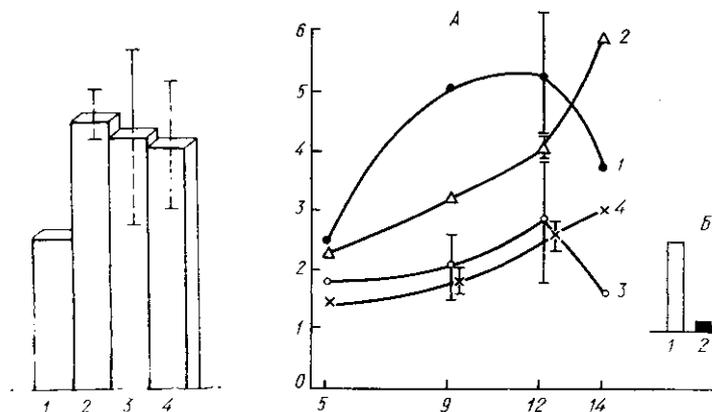


Рис. 2. Усиление включения ^3H -уридина после инъекции чужеродных нмРНК развивающимся зародышам вьюна, имп/мин/А₂₆₀: 1 — контроль; 2 — нмРНК таракана; 3 — нмРНК лягушки; 4 — нмРНК млекопитающих (опухоль Кребса).

Fig. 2. The enhancement of ^3H uridine incorporation after injection of heterologous snRNA into developing loach embryos (cpm/OD₂₆₀) control (1); cockroach snRNA (2); frog snRNA (3); mammalian snRNA (Krebs carcinoma) (4).

Рис. 3. Координированный перенос нмРНК и НГБ из цитоплазмы в ядра клеток развивающихся зародышей вьюна. А. Транспорт НГБ. Накопление в ядрах новосинтезированных белков (^{14}C -триптофан) после инъекции нмРНК (1) и в контроле (2). Накопление в ядрах запасенных белков (^3H -триптофан) после инъекции нмРНК (3) и в контроле (4). По оси абсцисс — время развития зародышей в ч при 21 °С; по оси ординат — соотношение радиоактивности фракций ядер и цитоплазмы. Б. Распределение суммарной фракции нмРНК, меченных ^3H -уридином, в клетках зародышей вьюна на стадии ранней-средней гастрюлы: ядра (1); цитоплазма (2).

Fig. 3. The coordinated transport of snRNA and nonhistone proteins from cytoplasm into cell nuclei of developing loach embryos. A. Transport of nonhistone proteins. Accumulation of newly synthesized proteins in nuclei (^{14}C triptophan) after snRNA injection (1) and in control (2). Accumulation of stored proteins (^3H triptophan) in nuclei: after snRNA injection (3) and in control (4). B. Distribution of total snRNA fraction labelled with ^3H uridine in loach embryo cells at the early-middle gastrula stage: nuclei (1); cytoplasm (2).

концентрации метки в ядре и цитоплазме (в пересчете на единицу объема) показывает, что и запасенные (долгоживущие), и новосинтезированные (краткоживущие) белки накапливаются в ядрах клеток опытных зародышей интенсивнее, чем в контроле. Иными словами, на стадиях 9—12 ч развития, когда в клетках развивающегося зародыша имеется избыток нмРНК, транспорт НГБ из цитоплазмы в ядра возрастает. Однако уже на стадии 14 ч развития этот эффект исчезает.

Нами были поставлены дополнительные опыты для изучения внутриклеточного перемещения введенных нмРНК. Оказалось, что после инъекции меченные ^3H -уридином нмРНК быстро покидают цитоплазму и избирательно накапливаются в ядрах зародышей (рис. 3, Б).

Обсуждение результатов. Представленные результаты показывают, что в разных опытах эффект усиления включения предшественников проявляется в разной степени. Причинами этого могут быть использование партий икры, полученных от разных самок и в разное

время года — от октября до июня, и использование препаратов мРНК, которые также были получены из разных партий икры в разное время года.

Время влияния мРНК на биосинтез макромолекул ограничено указанными периодами раннего эмбриогенеза. Повторная инъекция мРНК на стадиях поздней бластулы — ранней гаструлы не приводит к дальнейшему усилению интенсивности включения предшественников или удлинению периода их действия. Возможны несколько объяснений этого: 1) мРНК, введенные на поздних стадиях развития, не проникают в клетки зародыша и остаются в желтке; 2) по мере дифференцировки клеток происходит изменение регуляции на фоне увеличения содержания эндогенных мРНК и, следовательно, ограничения возможностей экзогенных мРНК; 3) изменяется компетенция зародышей, что выражается в снижении числа доступных сайтов регуляции.

На стадии 6 ч развития зародыш вьюна претерпевает существенные перестройки — деление клеток десинхронизуется, удлиняется клеточный цикл, активируется геном зародыша [21]. Эти принципиально важные события как-то взаимосвязаны с появлением в клетках мРНК, синтез которых выявлен на 4, 5—6-м часу развития [22], т. е. до и во время перестройки программы развития. К этому времени клетки зародыша уже обеспечены НГБ, синтезированными в оогенезе [21]. Переход НГБ — вероятных регуляторов активности генов — в ядра клеток происходит в форме РНП, т. е. в комплексе с РНК. Отправной точкой этого процесса может быть появление в клетках зародыша мРНК. Вследствие появления в клетках мРНК образуются РНП, которые переходят в ядра клеток зародыша. В этом проявляется белково-транспортная функция мРНК [31]. НГБ участвуют в регуляции транскрипции. Как мы увидим ниже, полученные результаты можно истолковать в пользу именно такой последовательности событий.

Действительно, увеличение содержания мРНК в развивающихся зародышах вьюна приводит к усилению активности аппарата биосинтеза макромолекул, но не затрагивает стадию активации транскрипции. Очевидно, определяющую роль в активации генома зародыша выполняют иные механизмы, например изменение соотношения ДНК и цитоплазмы [23]. Увеличение содержания мРНК усиливает интенсивность тех процессов, которые уже начались, т. е. содержание мРНК в зародыше можно рассматривать в качестве фактора, лимитирующего эти процессы. Интенсивность включения предшественников в РНК под действием мРНК может возрасти почти в четыре раза (а иногда и более), следовательно, можно говорить о том, что на ранних стадиях развития зародыш обладает существенным запасом молекул, необходимых для обеспечения работы аппарата транскрипции и, по аналогии, других звеньев аппарата биосинтеза макромолекул.

Графики, представленные на рис. 1, показывают среднюю картину событий, но в опытах по исследованию динамики изменения включения предшественников мы заметили, что если на каком-то из этапов наблюдается резкое усиление включения предшественников, то за этим следует крутое падение интенсивности включения (ниже уровня контроля). Если подъем интенсивности включения был более плавным, снижение также происходило плавно. Хорошей иллюстрацией этому могут служить результаты экспериментов с зародышами форели (таблица). Можно сказать, что графики, представленные на рис. 1, обозначают период потенциальной способности или компетенции зародышей интенсифицировать биосинтез макромолекул при увеличении содержания мРНК. В пределах этого периода максимальный уровень интенсивности включения и его продолжительность определяются, с одной стороны, интенсивностью стимула (содержанием активных фракций мРНК?), с другой — запасными ресурсами клеток (размерами пула нуклеотидов, АТФ и т. д.). Возможно, снижение стимуляции задается противодействием механизмов регуляции, которые действуют по принципу обратной связи.

Эффект усиления включения предшественников в макромолекулы характерен не только для эмбрионов вьюна. Эти наблюдения были подтверждены опытами на зародышах форели. Ранее Краузе и Рингетте [15] уже наблюдали активацию транскрипции в культуре фибробластов под действием нмРНК из опухолевых клеток. Связь периодов накопления нмРНК и периодов усиления активности генома была выявлена в оогенезе ксенопуса [24] и, наоборот, исчезновение нмРНК в эмбриогенезе форели из клеток сопровождается угнетением транскрипции [25].

После инъекции нмРНК накапливаются в ядрах клеток. Параллельно и координированно усиливается перемещение в ядра НГБ, которые в настоящее время рассматриваются в качестве возможных кандидатов на роль регуляторов активности генома. Правда, до сих пор в опытах *in vivo* эти предположения подтвердить не удалось [26]. Избыток НГБ в клетках, вероятно, характерен для многих объектов, и именно это обстоятельство может объяснить кажущееся отсутствие эффекта регуляции в опытах по микроинъекции НГБ.

Иницированное инъекцией нмРНК накопление в ядрах клеток НГБ, которое мы отметили у вьюна, соответствует наблюдениям, проведенным на других объектах [24, 27, 32], и может быть использовано как подтверждение предположений о важной роли нмРНК в транспорте НГБ [27, 31]. Исследования последних лет позволили конкретизировать некоторые детали участия нмРНК в жизнедеятельности клетки. Ныне полагают, что нмРНК участвуют в узнавании промоторов [28], процессинге мРНК, полиаденилировании мРНК [29], формировании 3'-конца [30], сплайсинге [10].

Механизм усиления макромолекулярных синтезов, который был выявлен нами, пока исследован недостаточно, однако уже сейчас можно связать эти события с координированным перемещением в ядра клеток нмРНК и НГБ. Дальнейшие исследования на этой перспективной модели позволят, как мы полагаем, выявить более тонкие механизмы, которые лежат в основе этих событий.

ENHANCEMENT OF GENETIC APPARATUS OF TELEOST FISH EMBRYOS AFTER snRNA MICROINJECTION

V. P. Korzh, T. A. Burakova, A. A. Neyfakh
N. K. Koltsov Institute of Developmental Biology,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A. L. Mazin

M. V. Lomonosov State University, Moscow

Summary

Amount of snRNA was increased artificially by microinjection into developing embryos of teleost fishes. Radiolabelled snRNA after microinjection into loach embryo is concentrated in cell nuclei. Transport of nonhistone proteins into nuclei increases simultaneously. snRNA injection enhances the incorporation of radiolabelled precursors into DNA (late blastula), RNA (late blastula — gastrula), proteins (late blastula — gastrula — early organogenesis). Such effects are characteristic of snRNA from teleost fishes, insects, amphibia and mammalia. Experiments with trout embryos support these results. The data obtained show the important role of snRNA in embryo genome activity regulation at early embryogenesis of teleost fishes.

1. Murray V., Holliday R. Mechanism for RNA splicing of gene transcripts.— FEBS Lett., 1979, 106, N 1, p. 5—7.
2. Are snRNPs involved in splicing? / M. R. Lerner, J. A. Boyle, S. M. Mount, J. A. Steitz.— Nature, 1980, 283, N 5743, p. 220—224.
3. Rogers J., Wall R. A mechanism for RNA splicing.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, 77, N 1, p. 1877—1879.
4. Novel model for RNA splicing that involves a small nuclear RNA / Y. Ohshima, M. Iton, N. Okada, T. Miyata.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, 78, N 7, p. 4471—4474.

5. *Gojobori T., Masatoshi N.* Inter RNA homology and possible roles of small RNAs.— *J. Mol. Evol.*, 1981, 17, N 4, p. 245—250.
6. A small nuclear ribonucleoprotein is required for splicing of adenoviral early RNA sequences / V. Yang, M. R. Lerner, J. A. Steitz, S. J. Flint.— *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 1981, 78, N 3, p. 1371—1375.
7. Splicing of messenger RNA precursors is inhibited by antisera to small nuclear ribonucleoprotein / R. Padgett, S. M. Mount, J. A. Steitz, P. Sharp.— *Cell*, 1983, 35, N 1, p. 101—107.
8. Плюснин А. З., Козлов А. П. Низкомолекулярные ядерные РНК.— *Успехи совр. биологии*, 1979, 88, № 3, с. 322—336.
9. snRNAs, snRNPs and RNA processing / H. Busch, R. Reddy, L. Rothblum, Y. C. Choi.— *Ann. Rev. Biochem.*, 1982, 51, p. 617—654.
10. Walter P., Blobel G. Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum.— *Nature*, 1982, 299, N 5885, p. 691—699.
11. Козлов А. П., Плюснин А. З., Евтушенко В. И. Изучение влияния низкомолекулярных ядерных РНК на синтез РНК в изолированных ядрах.— *Молекуляр. биология*, 1978, 12, № 1, с. 91—99.
12. Изучение влияния низкомолекулярных РНК на активность РНК-полимеразы II в ядрах печени крысы / А. П. Козлов, А. З. Плюснин, В. И. Евтушенко, И. Ф. Сейц.— *Биохимия*, 1979, 44, № 1, с. 27—32.
13. Дзидзигури Д. В., Туманишвили Г. Д. Факторы ядерного сока, регулирующие РНК-полимеразную активность.— В кн.: Тез. докл. Респ. науч. конф. по энзимологии. Тбилиси, 1981, с. 36.
14. Kanehisa T., Oki T., Ikuta K. Partial specificity of low-molecular weight RNA that stimulates RNA synthesis in various tissues.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1974, 165, N 1, p. 146—152.
15. Krause M. O., Ringuette M. Low molecular weight nuclear RNA from SV40 transformed WI38 cells; effect on transcription of WI38 chromatin in vitro.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1977, 76, N 3, p. 796—803.
16. Specific small nuclear RNAs from SV40-transformed cells stimulate transcription initiation in nontransformed isolated nuclei / M. Ringuette, K. Gordon, J. Szyszko, M. Krause.— *Can. J. Biochem.*, 1982, 60, N 3, p. 262—280.
17. Активация синтеза РНК в зародышах вьюна после инъекции экстракта ядер, полученного с помощью 0,35 М NaCl / Т. А. Буракова, В. П. Корж, Н. А. Шостак, А. А. Нейфах.— *Молекуляр. биология*, 1980, 14, № 4, с. 922—927.
18. Буракова Т. А., Корж В. П., Нейфах А. А. Инъекция низкомолекулярных РНК в эмбрионы вьюна активирует синтез макромолекул.— *Докл. АН СССР*, 1984, 274, № 2, с. 413—416.
19. Нейфах А. А. Использование метода радиационной инактивации ядер для исследования их функции в раннем развитии рыб.— *Журн. общ. биологии*, 1959, 20, № 3, с. 202—213.
20. Корж В. П. Микроинъекции макромолекул и митохондрий в яйца вьюна.— *Онтогенез*, 1981, 12, № 2, с. 187—192.
21. Нейфах А. А., Тимофеева М. Я. Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития.— М.: Наука, 1978.— 337 с.
22. Соловьева И. А., Тимофеева М. Я. Низкомолекулярные РНК в эмбриогенезе вьюна.— *Молекуляр. биология*, 1973, 7, № 6, с. 908—917.
23. Newport J., Kirshner M. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos. II. Control of the onset of transition.— *Cell*, 1982, 30, N 3, p. 687—696.
24. Zeller R., Nuffenegger T., De Robertis E. M. Nucleocytoplasmic distribution of snRNPs and stockpiled snRNA-binding proteins during oogenesis and early development in *Xenopus laevis*.— *Cell*, 1983, 32, N 2, p. 425—434.
25. Nebiolo G., Dixon G. H. Characterization and subcellular localization of low molecular weight RNAs in developing trout testis.— *J. Cell Biol.*, 1982, 95, N 2, p. 740a.
26. Каравинов А. А., Афинасьев Б. Негистоновые белки хроматина.— *Молекуляр. биология*, 1983, 17, № 2, с. 213—233.
27. De Robertis E. M., Lienhard S., Parisot R. F. Intracellular transport of microinjected 5S and small nuclear RNAs.— *Nature*, 1982, 295, N 5757, p. 572—577.
28. Krause M. O., Sohn U., Szyszko J. Promoter recognition by a small nuclear RNA.— *J. Cell Biol.*, 1983, 97, N 5, p. 358a.
29. Berget S. M. Are U4 small nuclear ribonucleoproteins involved in polyadenylation.— *Nature*, 1984, 309, N 5964, p. 179—181.
30. Biochemical complementation with RNA in the *Xenopus* oocyte: a small RNA is required for the generation of 3' histone mRNA termini / G. Galli, H. Hofstetter, H. G. Stunnenberg, M. L. Birnstiel.— *Cell*, 1983, 34, N 3, p. 823—828.
31. Мазин А. Л. Низкомолекулярные РНК эукариот: биогенез, субклеточная локализация, функции.— *Молекуляр. биология*, 1983, 17, № 4, с. 755—783.
32. Forbes D., Kornberg T. B., Kirshner M. Small nuclear RNA transcription and ribonucleoprotein assembly in early *Xenopus* development.— *J. Cell Biol.*, 1983, 97, N 1, p. 62—72.

Ин-т биологии развития
им. Н. К. Кольцова АН СССР, Москва
МГУ им. М. В. Ломоносова

Получено 20.08.84