



УДК 577.218

ФАКТОР РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ Ybx1 СТАБИЛИЗИРУЕТ МАТЕРИНСКУЮ мРНК ГЕНА *ssx2ip*, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК СОЗРЕВАНИЯ ЦЕНТРОСОМ, В ЭМБРИОНАЛЬНОМ РАЗВИТИИ ЛЯГУШКИ *Xenopus laevis*

© 2024 г. Е. А. Паршина*, А. Г. Зарайский*, Н. Ю. Мартынова*,#

* ФГБУН “Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 07.09.2023 г.

После доработки 17.09.2023 г.

Принята к публикации 18.09.2023 г.

Данная работа – продолжение наших исследований механизмов регуляции экспрессии генов раннего развития с использованием модельного организма – эмбрионов лягушки *Xenopus laevis*. Ранее мы обнаружили, что материнская мРНК двух важных для развития генов – *pou5f3* (ген фактора плюрипотентности семейства) и *rarg* (ген ядерного рецептора ретиноевой кислоты) – образует комплексы с белком рибонуклеопротеиновых комплексов Ybx1, который стабилизирует эти мРНК. В настоящей работе мы показали, что стабильность материнской мРНК *ssx2ip*, кодирующей консервативный белок Ssx2ip (известный также как Msd1 или ADIP, компонент созревания centrosom), также регулируется РНК-связывающим фактором Ybx1. В частности, мы выяснили, что Ybx1 образует рибонуклеопротеиновый комплекс с мРНК *ssx2ip*, в котором участвует домен холодового шока (CSD) фактора Ybx1. Полученные результаты подтверждают предложенную нами гипотезу о селективном связывании фактора Ybx1 с материнскими транскриптами и открывают возможности для поиска возможных *цис*-мотивов для узнавания *транс*-регуляторами, подобными Ybx1, что важно для изучения подобных механизмов регуляции генной экспрессии.

Ключевые слова: эмбриогенез, рибонуклеопротеиновый комплекс, мРНК, белок Ybx1, материнские транскрипты, *ssx2ip*

DOI: 10.31857/S0132342324030133, **EDN:** NXVOFU

ВВЕДЕНИЕ

Материнские мРНК и белки определяют раннее эмбриональное развитие до активации зиготического генома [1]. Перед активацией зиготического генома транскрипционно неактивные ранние эмбрионы зависят исключительно от материнских транскриптов и белков, накопленных в оогенезе и необходимых для начальных стадий развития, включая оплодотворение, дробление

и раннюю разметку эмбриона [2]. Чтобы стимулировать созревание ооцитов и ранний эмбриогенез в отсутствие транскрипции, стабильность транскриптов и синтез белка необходимо точно настроить с помощью специальных регуляторов трансляции, нацеленных на нужные группы материнских мРНК [3–9]. Регуляция стабильности и трансляции материнских транскриптов определяется комбинацией *цис*-мотивов, присутст-

Сокращения: CSD – домен холодового шока; LIM-домен – от первых букв названий трех белков, у которых был впервые описан данный домен: LIN-11, Isl-1 и MEC-3; 6Myc-C-Ybx1 – делеционный мутант белка Ybx1, содержащий последовательности шести пептидов Myc; 6Myc-Ybx1 – полноразмерный белок Ybx1, содержащий последовательности шести пептидов Myc; *pou5f3* – ген, кодирующий фактор плюрипотентности; RIPA – метод рибоиммунопреципитации; *rarg* – ген, кодирующий ядерный рецептор ретиноевой кислоты; *ssx2ip* – ген, кодирующий консервативный белок Ssx2ip (Msd1, ADIP), компонент созревания centrosom; Ybx1 – фактор рибонуклеопротеиновых комплексов; MO – морфолиновые олигонуклеотиды; мРНК – матричные рибонуклеопротеиды.

Автор для связи: (тел.: +7 (916) 181-16-32; эл. почта: martnat61@gmail.com).

вующих в мРНК, и *транс*-регуляторов, РНК-связывающих белков, которые связываются с этими последовательностями.

Белок Ybx1 – один из наиболее изученных *транс*-регуляторов, способных эффективно стабилизировать мРНК, предотвращая ее деградацию. В этом процессе ключевую роль играет его домен холодового шока (CSD), который отвечает за связывание с РНК. Образуя компактные мРНК (матричные рибонуклеопротеиды) с недоступными экзонуклеазам 5'- и 3'-концами, Ybx1 ингибирует трансляцию и стабилизирует мРНК [10]. Этот механизм очень важен для половых клеток, особенно ооцитов. Показано, что нокаут гомолога Ybx1, основного зародышевого белка MSY2 мыши, приводит к дестабилизации мРНК и, следовательно, к остановке роста и созреванию ооцитов [11]. В ооцитах MSY2 упаковывает мРНК в очень компактные комплексы, недоступные для клеточного аппарата деградации мРНК. Во время созревания ооцитов MSY2 фосфорилируется киназой CDK1, что вызывает переход MSY2-содержащих мРНК в менее компактные комплексы. Таким образом, запускается и трансляция, и распад мРНК [12]. Кроме этого, в случае развивающихся эмбрионов важно, чтобы материнские мРНК локализовались в определенных областях ооцита или эмбриона, где они затем транслируются в белок. Это помогает установить асимметрию в развивающемся организме, т.е. производить ткани, которые в конечном итоге станут верхней или нижней, передней или задней, левой или правой частью организма. Показано, что у эмбрионов рыбки *Danio rerio* Ybx1 не только предотвращает преждевременную трансляцию и передачу сигналов Sqt/Nodal, но и участвует в локализации транскриптов *Sqt/Nodal* в дорсальной половине эмбриона [13].

Изучение регуляции экспрессии Ssx2ip представляет интерес в связи с тем, что этот белок участвует в закоривании микротрубочек на центросоме, вовлечен в организацию актинового цитоскелета [14] и, взаимодействуя с несколькими мембранными белками в ресничках, принимает участие в процессе цилиогенеза. Кроме этого, показана важная функция данного белка в раннем развитии: нокаут Msd1, ортолога Ssx2ip из рыбки *D. rerio*, вызывает нарушение лево-правой асимметрии эмбриона [15]. Следует отметить, что участие гена *ssx2ip* в эмбриональном развитии только начинает привлекать внимание исследователей. Совсем недавно появилась работа с использованием эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* [16], в которой было обнаружено его взаимодействие с N-концевым доменом белка Wtip (Wilms tumor-1-interacting

protein), представляющим собой адаптер, который содержит LIM-домены и модулирует сократимость актомиозина и цилиогенез у эмбрионов *X. laevis*. Wtip – представитель семейства зиксин-подобных белков. Его C-конец Wtip с тремя LIM-доменами ассоциирован с актин-связывающим белком Shroom3 и модулирует апикальное сужение в эктодерме клетки [16]. В то же время N-концевой домен Wtip локализуется в базальных тельцах в многореснитчатых клетках [16], и его взаимодействующие партнеры были неизвестны до этого исследования. Интересно, что одновременный нокаут двух генов – *wtip* и *ssx2ip* – у ранних эмбрионов *X. laevis* выявил функциональное взаимодействие их белков во время закрытия нервной трубки [16]. Это указывает на возможную роль комплекса Wtip с Ssx2ip в ремоделировании клеточных контактов при морфогенезе нервной трубки.

В нашей предыдущей работе мы показали, что в раннем эмбриогенезе шпорцевой лягушки Ybx1 взаимодействует с белком зиксином, родственником Wtip [17]. Такое взаимодействие приводит к вытеснению мРНК белка эмбрионального стволового статуса клеток, Pou5f3.3 (ортолог OCT4 млекопитающих), а также мРНК рецептора ретиноевой кислоты Rrxg из их комплекса с Ybx1, что приводит к дестабилизации этих мРНК [17, 18]. Соответственно, искусственное снижение концентрации белка зиксина в эмбрионе вызывало увеличение концентрации мРНК *pou5f3.3* и *rxrg*. В результате широкоформатного поиска с применением секвенирования нового поколения генов, экспрессия которых изменяется в клетках эмбриона шпорцевой лягушки *X. laevis* в ответ на искусственное подавление экспрессии гена *zuxin*, помимо генов *pou5f3.3* и *rxrg* мы обнаружили ген *ssx2ip* [17, 18], кодирующий белок Ssx2ip. В связи с этим мы предположили, что стабильность мРНК *ssx2ip* может регулироваться аналогично мРНК *pou5f3.3* и *rxrg*, т.е. за счет образования комплекса с белком-шапероном рибонуклеопротеиновых комплексов Ybx1 [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проверки профиля экспрессии *ssx2ip* по стадиям развития у эмбрионов *X. laevis* по имеющейся базе данных Xenbase (<https://www.xenbase.org/xenbase/>) оказалось, что это материнский ген, т.е. его мРНК запасается в ооцитах, сохраняется на ранних стадиях дробления и после активации генома зародыша уничтожается (рис. 1а, профили экспрессии). Поскольку мы показали способность белка Ybx1 специфично связывать и предохранять именно материнскую

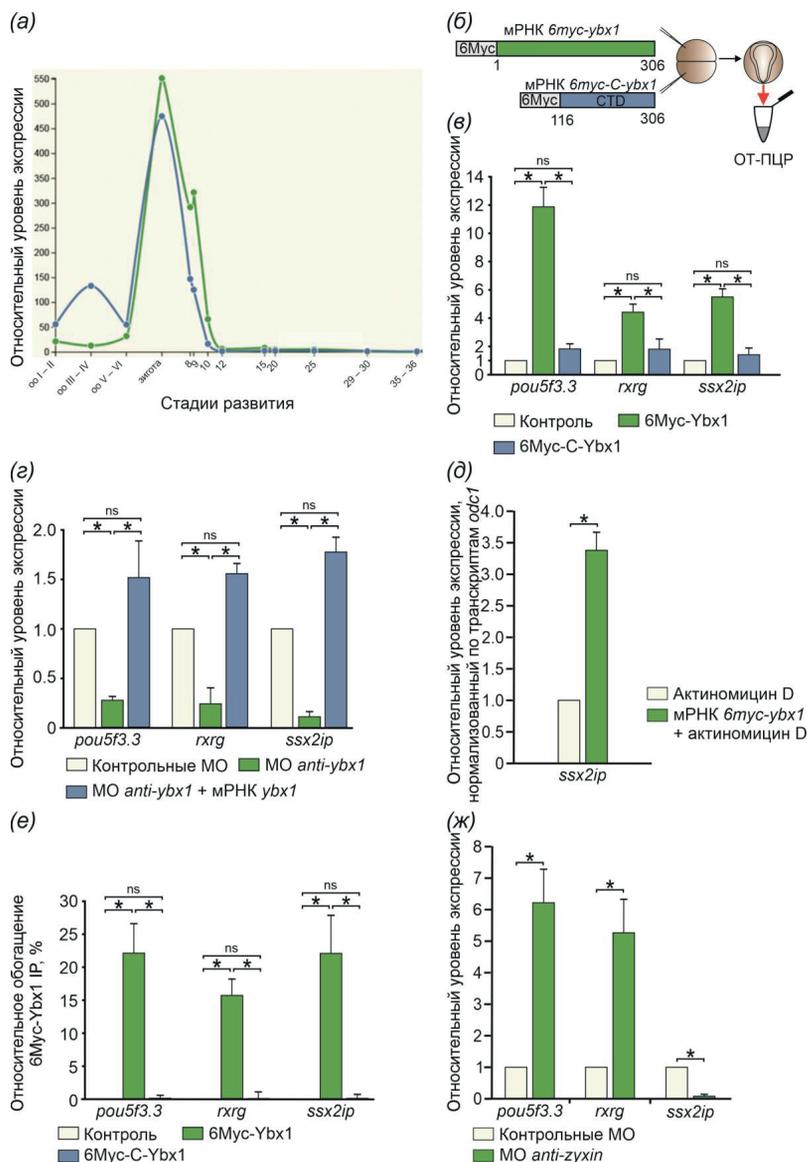


Рис. 1. (а) – Профиль экспрессии материнского гена *ssx2ip* (L-гомолог – зеленый, S-гомолог – синий) по стадиям развития лягушки *X. laevis* (по Xenbase); (б) – схема эксперимента по микроинъекциям в эмбрионы *X. laevis*; (в) – влияние экзогенных белков 6Мус-Ybx1 и 6Мус-C-Ybx1 на уровень мРНК гена *ssx2ip* в сравнении с ранее обнаруженными [17, 18] генами *pou5f3.3* и *rxrg*, выявленное методом ОТ-ПЦР (* $p < 0.05$, ns – статистически незначимо); (г) – влияние подавления трансляции морфолиновыми олигонуклеотидами (МО) мРНК *ybx1* на количество мРНК материнских генов *pou5f3.3*, *rxrg*, *ssx2ip* и восстановление нормального уровня этих транскриптов инъекцией синтетической РНК *bmusc-ybx1*, выявленное методом ОТ-ПЦР (* $p < 0.01$, ns – статистически незначимо); (д) – уровень мРНК *ssx2ip* в ответ на микроинъекции синтетической мРНК *bmusc-ybx1* в условиях блокирования транскрипции актиномицином D, выявленное методом ОТ-ПЦР (* $p < 0.05$, ns – статистически незначимо). Для нормализации данных использовали ОТ-ПЦР с мРНК гена домашнего хозяйства *odc1*. Все вышеприведенные данные, выявленные методом ОТ-ПЦР, представлены в виде кратного изменения экспрессии генов в опытных эмбрионах по сравнению с экспрессией в контрольных эмбрионах. Во всех случаях для нормализации данных использовали гены *odc1* и *eef1a1*, показаны стандартные отклонения, полученные в результате трех независимых экспериментов; (е) – результаты РНК-иммунопреципитации: осаждение факторами 6Мус-Ybx1 и 6Мус-C-Ybx1 мРНК *ssx2ip* в сравнении с ранее изученными мРНК *rxrg* и *pou5f3.3* [17, 18] (* $p < 0.01$, ns – статистически незначимо). В качестве контроля использовали смолу с антителами анти-Flag. Данные представлены в виде процентного соотношения связавшихся мРНК к общему количеству данной мРНК в лизате. Во всех случаях показаны стандартные отклонения, полученные в результате трех независимых экспериментов; (ж) – эффект от подавления трансляции мРНК цитоскелетного белка зиксина морфолиновыми олигонуклеотидами (* $p < 0.05$, ns – статистически незначимо). Количество мРНК *ssx2ip* уменьшается, в то время как уровень мРНК генов *pou5f3.3* и *rxrg* возрастает в ответ на нокадаун гена *zyxin*.

мРНК от деградации [17, 18], было интересно проверить этот феномен на материнской мРНК еще одного гена.

Исследования проводили по предложенной ранее [17, 18] схеме: во-первых, посмотрели ответ на усиление/подавление уровня фактора Ybx1 и проверили специфичность результатов методом “спасения” (*rescue*); во-вторых, исключили возможность активации экспрессии гена *ssx2ip* фактором Ybx1, подтвердив увеличение количества его мРНК в условиях тотального подавления транскрипции; в-третьих, проверили методом рибоиммунопреципитации (RIPA) способность Ybx1 к образованию комплексов непосредственно с мРНК гена *ssx2ip*.

Для усиления экспрессии Ybx1 мы использовали имеющиеся плазмиды для получения синтетической мРНК, кодирующие полноразмерный меченный 6Мус-эпитопом фактор Ybx1 (6Мус-Ybx1) и делеционный мутант Ybx1 (6Мус-C-Ybx1) без N-концевой части, включающей домен холодового шока (CSD) [17]. Укороченный с N-конца мутант, лишенный CSD, использовали в качестве отрицательного контроля. Схемы конструкций приведены на рис. 1б. Микроинъекции РНК в эмбрионы проводили в два бластомера с инкубацией до стадии гастрюлы (11-я стадия). Далее зародыши лизировали, выделяли тотальную РНК [17, 18], а затем проводили количественную оценку транскриптов исследуемого гена и материнских генов *pou5f3.3* и *rxrg* в качестве положительного контроля методом ОТ-ПЦР.

В результате мы показали, что сверхэкспрессия только полноразмерного фактора 6Мус-Ybx1 приводит к значительному увеличению количества транскриптов *ssx2ip*, сравнимому с уровнем усиления экспрессии гена *pou5f3.3* (рис. 1в).

При подавлении экспрессии Ybx1 наблюдалось уменьшение количества мРНК *ssx2ip*, но при добавлении синтетической мРНК *6мус-Ybx1* происходило восстановление (спасение, *rescue*) исходного уровня транскриптов *ssx2ip* (рис. 1з). Это подтверждает специфичность наблюдаемого ответа на изменение уровня Ybx1.

Экспрессию Мус-тагированного Ybx1 и его делеционного мутанта подтверждали методом вестерн-блоттинга. С использованием антител к Мус-пептиду были детектированы полосы с соответствующей расчетным молекулярным массам электрофоретической подвижностью (45 кДа для 6Мус-C-Ybx1 и 60 кДа для 6Мус-Ybx1 [17]).

Для проверки возможности активации транскрипции мРНК *ssx2ip* мы проверили изменение ее количества в ответ на повышение концентрации Ybx1 в условиях тотального ингиби-

рования транскрипции актиномицином D. Мы использовали отработанную ранее методику по инъекциям ингибитора транскрипции в полость бластоцеля [17]. Поскольку при полном ингибировании транскрипции уровень мРНК *ssx2ip* у эмбрионов со сверхэкспрессией Ybx1 был намного выше, чем у контрольных, мы подтвердили, что это увеличение происходит за счет стабилизации материнской мРНК, накопленной в ооцитах (рис. 1д).

Полученные результаты дают возможность предположить, что белок Ybx1 связывает мРНК *ssx2ip*, образуя стабильный рибонуклеопротеиновый комплекс. Применив разработанный нами метод RIPA (RiboImmunoPrecipitation) [20], мы показали образование комплекса между полноразмерным 6Мус-Ybx1 и мРНК *ssx2ip*, которое сравнили с изученными генами *pou5f3.3* и *rxrg*. Следует отметить, что делеционный мутант 6Мус-C-Ybx1, лишенный CSD и содержащий только C-концевой домен, и в этом случае не смог образовать устойчивый комплекс, что доказывает необходимость наличия домена холодового шока для взаимодействия Ybx1 с РНК.

Ранее мы показали, что при понижении уровня цитоскелетного белка зиксина происходит возрастание уровня мРНК двух материнских генов: гена *pou5f3.3*, маркера стволовых клеток, гомолога известного фактора млекопитающих OCT4, и гена *rxrg*, ядерного рецептора ретиноевой кислоты, и что механизм этого явления связан с отрицательным влиянием зиксина на стабильность комплексов этих мРНК с фактором Ybx1 [17, 18].

Было интересно проверить, как влияет подавление зиксина, компонента комплекса фокальной адгезии, на уровень мРНК белка Ssx2ip. Мы использовали отработанную ранее методику подавления трансляции зиксина в клетках эмбрионов морфолиновыми олигонуклеотидами (МО) [17, 18, 21]. В качестве положительных контролей выбрали гены *pou5f3.3* и *rxrg*, экспрессия которых стабильно повышается при подавлении зиксина [17]. В результате мы обнаружили, что в отличие от двух ранее изученных нами генов, в ответ на подавление зиксина наблюдается уменьшение количества транскриптов *ssx2ip* (рис. 1ж). Это наводит на предположение о том, что стабильность мРНК *ssx2ip* регулируется с участием зиксина, возможно, по другому механизму. Эти данные имеют большую ценность, поскольку показывают, что, во-первых, предложенный нами ранее механизм регуляции стабильности мРНК генов стволового статуса клеток за счет взаимодействия зиксина и Ybx1 специфичен именно для генов, участвующих в регуляции дифференцировки клеток; во-вторых, учитывая данные по ассоциации Ssx2ip с Wtip, не исключена

возможность взаимной регуляции экспрессии цитоскелетных белков *Ssx2ip* и зиксина на ранних стадиях развития. Идентификация материнского гена *ssx2ip*, стабильность транскриптов которого зависит от *Ybx1* по зиксин-независимому механизму, открывает перспективы по поиску и изучению других механизмов регуляции стабильности и, возможно, трансляционной активности материнских мРНК, взаимодействующих с фактором *Ybx1*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение векторов. Стратегии создания ДНК-конструкций подробно описаны в работе Parshina et al. [17]. Векторные конструкции для экспрессии белка *Ybx1* (Gene ID: 379054, база данных NCBI) представлены в табл. 1.

Получение синтетической мРНК и микроинъекции мРНК в зародыши *X. laevis*. Получение зародышей *X. laevis* и искусственное оплодотворение, а также синтез мРНК и микроинъекции проводили по методике, разработанной нами ранее [21].

Выделение тотальной РНК из эмбрионов *X. laevis*, получение кДНК и ОТ-ПЦР. Зародыши

X. laevis лизировали в тризоле и выделяли тотальную РНК [17, 18] с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) и набора CleanRNA (Евроген) в соответствии с инструкциями производителя. кДНК синтезировали с использованием набора MMLV RT (Евроген) из 250 нг РНК-образца, а для ПЦР применяли qPCRmix-HS SYBR (Евроген). ОТ-ПЦР проводили в амплификаторе DTPprime 4 qPCR (ДНК-Технология, Россия) по методике, разработанной нами ранее [17, 21]. Последовательности праймеров представлены в табл. 2. В качестве положительных контролей использовали материнские гены *pou5f3.3* и *rxrg*. Для проверки статистической достоверности данные ОТ-ПЦР, полученные от трех независимых экспериментов, переносили в программу Microsoft Excel и анализировали с использованием метода $\Delta\Delta Ct$ [22]. Для нормирования уровня экспрессии генов в качестве внутренних контролей использовали уровни экспрессии генов *eef1a1* и *odc1*, кодирующих, соответственно, фактор элонгации EF-1 α и орнитиндекарбоксилазу (ODC).

Блокирование трансляции эндогенной мРНК инъекцией антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов (МО). Для подавления экс-

Таблица 1. Векторные конструкции на основе плазмиды pCS2-MT для экспрессии белка *Ybx1*

ДНК-конструкция	Праймеры и стратегии клонирования, использованные для создания ДНК-матриц для синтетических мРНК
pCS2MT-Ybx1	1) ПЦР с тотальной кДНК <i>X. laevis</i> с праймерами: F 5'-ATGCCCATGGTTATGAGC-AGCGAGGTTGAAACAC-3' и R 5'-ATGCCTCGAGTTACTCAGCCCCGCCCTGCT-CAGCC-3' 2) Рестрикция по сайтам NcoI и XhoI, лигирование в плазмиду pCS2-MT
pCS2MT-CTD Ybx1	1) Рестрикция pB42-CTD Ybx1 по сайтам EcoRI и XhoI 2) Клонирование CTD Ybx1 в плазмиду pCS2-MT R1

Таблица 2. Праймеры для ОТ-ПЦР, использованные в работе

Ген	Последовательности праймеров (5'-3')	Длина ПЦР-фрагмента, п.н.
<i>odc1</i>	F: GCCAGTTCTAACAAAGAAACCCA R: TCTACGATACGATCCAGCCCA	93
<i>eef1a1</i>	F: GTTCATTTACCGCACAGGTTATCA R: ACACAGGGGCATATCCAGCA	70
<i>ssx2ip</i>	F: TCGTGTGTCCTTGCTATTCCT R: CCAACATAAAAGAGTTTGAGGGGA	91
<i>rxrg</i>	F: CTTCCTTCTCGCACCGCTC R: GCCTACTCCCGCATTTGTGT	98
<i>pou5f3.3</i>	F: CACA AAACTGGACTTACTGGGG R: TCTCAACTGCCCTTACCTTCTC	70

прессии Ybx1 трансляцию его эндогенной мРНК блокировали путем инъекций антисмысловых (анти-Ybx1) морфолиновых олигонуклеотидов (МО, 0.5 мМ) в два бластомера на стадии начала дробления, инкубировали также до стадии 13, гастролы [17].

Блокирование транскрипции актиномицином D. Транскрипцию в эмбрионах *X. laevis* подавляли путем микроинъекции 0.2 мМ актиномицина D (Sigma, США) в бластоцель на стадии 7. Эмбрионы развивались до стадии 13.

Осаждение рибонуклеопротеиновых комплексов методом рибонуклеопротеинового осаждения (RIPA). Осаждение рибонуклеопротеиновых комплексов проводили из лизатов зародышей *X. laevis* на стадии ранней гастролы, инъекцированных синтетическими мРНК, кодирующими полноразмерный белок 6Мус-Ybx1 (опыт) и делеционный мутант 6Мус-С-Ybx1 (отрицательный контроль). Для осаждения использовали разработанную нами ранее методику [17, 20].

Гель-электрофорез и иммуноблоттинг. Уровень белков Ybx1, 6Мус-Ybx1 и 6Мус-С-Ybx1 измеряли по разработанной нами методике [21] на лизатах эмбрионов *X. laevis* с помощью SDS-PAGE с последующим вестерн-блоттингом. Мус-содержащие белки детектировали при помощи моноклональных анти-Мус-антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой (Sigma, США). Стабилизированный субстрат Western Blue (Promega, США) использовали для обнаружения антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы установили, что белок Ybx1 способен связывать и стабилизировать мРНК, кодирующую белок Ssx2ip (synovial sarcoma X breakpoint 2 interacting protein), в клетках раннего эмбриона шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*.

Однако в отличие от мРНК *pou5f3.3* и *rxrg*, искусственное снижение концентрации зиксина в эмбрионе приводило не к увеличению, а к снижению концентрации мРНК *ssx2ip*, что указывает на возможно иной механизм регуляции белком зиксином стабильности этой мРНК.

Полученные результаты, во-первых, расширяют список мРНК, взаимодействующих в раннем эмбриогенезе с РНК-связывающим белком Ybx1, а во-вторых, открывают перспективу для изучения возможной роли цитоскелетного белка зиксина в регуляции экспрессии Ssx2ip в эмбриональном развитии.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-74-30005 (<https://rscf.ru/project/23-74-30005/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sun J., Yan L., Shen W., Meng A. // Development. 2018. V. 145. P. dev166587. <https://doi.org/10.1242/dev.166587>
2. Abrams E.W., Mullins M.C. // Curr. Opin. Genet. Dev. 2009. V. 19. P. 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.06.002>
3. Bazzini A.A., Del Viso F., Moreno-Mateos M.A., Johnstone T.G., Vejnar C.E., Qin Y., Yao J., Khokha M.K., Giraldez A.J. // EMBO J. 2016. V. 35. P. 2087–2103. <https://doi.org/10.15252/embj.201694699>
4. Chen J., Torcia S., Xie F., Lin C.J., Cakmak H., Franciosi F., Horner K., Onodera C., Song J.S., Cedars M.I., Ramalho-Santos M., Conti M. // Nat. Cell. Biol. 2013. V. 15. P. 1415–1423. <https://doi.org/10.1038/ncb2873>
5. Miao L., Yuan Y., Cheng F., Fang J., Zhou F., Ma W., Jiang Y., Huang X., Wang Y., Shan L., Chen D., Zhang J. // Development. 2017. V. 144. P. 128–138. <https://doi.org/10.1242/dev.144642>
6. Sha Q.Q., Dai X.X., Dang Y., Tang F., Liu J., Zhang Y.L., Fan H.Y. // Development. 2017. V. 144. P. 452–463. <https://doi.org/10.1242/dev.144410>
7. Tadros W., Goldman A.L., Babak T., Menzies F., Vardy L., Orr-Weaver T., Hughes T.R., Westwood J.T., Smibert C.A., Lipshitz H.D. // Dev. Cell. 2007. V. 12. P. 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.005>
8. Winata C.L., Łapiński M., Pryszcz L., Vaz C., Bin Ismail M.H., Nama S., Hajan H.S., Lee S.G.P., Korzh V., Sampath P., Tanavde V., Mathavan S. // Development. 2018. V. 145. P. dev159566. <https://doi.org/10.1242/dev.159566>

9. Giraldez A.J., Mishima Y., Rihel J., Grocock R.J., Van Dongen S., Inoue K., Enright A.J., Schier A.F. // *Science*. 2006. V. 312. P. 75–79.
<https://doi.org/10.1126/science.112268910>
10. Evdokimova V., Ruzanov P., Imataka H., Raught B., Svitkin Y., Ovchinnikov L.P., Sonenberg N. // *EMBO J*. 2001. V. 20. P. 5491–5502.
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.19.5491>
11. Medvedev S., Pan H., Schultz R.M. // *Biol. Reprod*. 2011. V. 85. P. 575–583.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.091710>
12. Medvedev S., Yang J., Hecht N.B., Schultz R.M. // *Dev. Biol*. 2008. V. 321. P. 205–215.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.06.016>
13. Kumari P., Gilligan P.C., Lim S., Tran L.D., Winkler S., Philp R., Sampath K. // *ELife*. V. 2. P. e00683.
<https://doi.org/10.7554/eLife.00683>
14. Asada M., Irie K., Morimoto K., Yamada A., Ikeda W., Takeuchi M., Takai Y. // *J. Biol. Chem*. 2003. V. 278. P. 4103–4111.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M209832200>
15. Hori A., Ikebe C., Tada M., Toda T. // *EMBO Rep*. 2014. V. 15. P. 175–184.
<https://doi.org/10.1002/embr.201337929>
16. Reis A.H., Xiang B., Ossipova O., Itoh K., Sokol S.Y. // *PLoS One*. 2021. V. 16. P. e0259068.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259068>
17. Parshina E.A., Eroshkin F.M., Orlov E.E., Gyoeva F.K., Shokhina A.G., Staroverov D.B., Belousov V.V., Zhigalova N.A., Prokhortchouk E.B., Zاراisky A.G., Martynova N.Y. // *Cell Rep*. 2020. V. 33. P. 108396.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108396>
18. Parshina E.A., Orlov E.E., Zاراisky A.G., Martynova N.Y. // *Int. J. Mol. Sci*. 2022. V. 23. P. 5627.
<https://doi.org/10.3390/ijms23105627>
19. Eliseeva I.A., Kim E.R., Guryanov S.G., Ovchinnikov L.P., Lyabin D.N. // *Biochemistry (Moscow)*. 2011. V. 76. P. 1402–1433.
<https://doi.org/10.1134/S0006297911130049>
20. Martynova N.Y., Parshina E.A., Zاراisky A.G. // *STAR Protoc*. 2021. V. 2. P. 100552.
<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100552>
21. Martynova N.Y., Parshina E.A., Eroshkin F.M., Zاراisky A.G. // *Russ. J. Bioorg. Chem*. 2020. V. 46. P. 530–536.
<https://doi.org/10.31857/S013234232004020X>
22. Livak K.J., Schmittgen T.D. // *Methods*. 2001. V. 25. P. 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

The Ribonucleoprotein Complex Factor Ybx1 Stabilizes the Maternal mRNA of the *ssx2ip* Gene Encoding the Centrosome Maturation Protein in *Xenopus laevis* Embryogenesis

E. A. Parshina*, A. G. Zاراisky*, and N. Y. Martynova*,#

Phone: +7 (916) 181-16-32; e-mail: martnat61@gmail.com

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

Our study investigates the mechanisms that regulate early developmental gene expression in *Xenopus laevis* frog embryos. Our previous study demonstrated that maternal mRNAs of two developmentally significant genes, the nuclear retinoic acid receptor *rxrg* and the pluripotency factor *pou5f3*, form complexes with ribonucleoprotein complex Ybx1. Based on the results of the present study, we determined and demonstrated that the stability of the maternal mRNA *ssx2ip*, which encodes a conserved protein, also called Msd1 or ADIP, which is involved in centrosome maturation, is dependent on Ybx1. This research shows that Ybx1 forms a ribonucleoprotein complex with *ssx2ip* mRNA, which is mediated by its cold shock domain (CSD). This study confirms our hypothesis of Ybx1 selectively binding to maternal transcripts. It opens up new opportunities to study new mechanisms of gene expression regulation at the earliest stages of development by searching for possible *cis*-motifs for recognition by *trans*-regulators such as Ybx1.

Keywords: embryogenesis, ribonucleoprotein complex, mRNA, Ybx1 protein, maternal transcripts, *ssx2ip*