



УДК 577.218

# ИЗОФОРМЫ ЦИТОСКЕЛЕТНОГО БЕЛКА ЗИКСИНА В РАННЕМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ *Xenopus laevis*

© 2024 г. Э. Д. Иванова\*, Е. А. Паршина\*\*, А. Г. Зарайский\*\*, Н. Ю. Мартынова\*\*,#

\* Российский национальный исследовательский медицинский университет  
им. Н.И. Пирогова Минздрава России,

Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

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

Поступила в редакцию 10.09.2023 г.

После доработки 22.09.2023 г.

Принята к публикации 23.09.2023 г.

Зиксин – консервативный механочувствительный LIM-доменный белок, регулирующий сборку F-актиновых филаментов в клеточных контактах. В то же время при механических воздействиях на клетки он может перемещаться из фокальных адгезий к стресс-фибриллам и в ядро, где оказывает влияние на генную экспрессию. С использованием метода вестерн-блоттинга и антител к N-концевой и C-концевой областям зиксина мы обнаружили, что в клетках эмбриона шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* этот белок представлен двумя полноразмерными и двумя короткими изоформами. Определена внутриклеточная локализация этих изоформ и их количество в зависимости от стадии развития эмбрионов. Показано, что полноразмерные формы с различной электрофоретической подвижностью отличаются по локализации в клетке, а самая короткая изоформа, содержащая LIM-домены, стабильна в ходе развития, преимущественно находится в ядре и может участвовать в регуляции экспрессии генов. Впервые полученные данные об изоформах зиксина, их стабильности и распределении между ядром и цитоплазмой представляют большой интерес для изучения функций LIM-доменных белков-механотрансдукторов в процессах взаимного влияния морфогенеза и дифференцировки на ранних этапах развития позвоночных.

*Ключевые слова:* изоформы белка, развитие, внутриклеточная локализация, зиксин, модификации, протеолиз

DOI: 10.31857/S0132342324030077, EDN: NZUWKW

## ВВЕДЕНИЕ

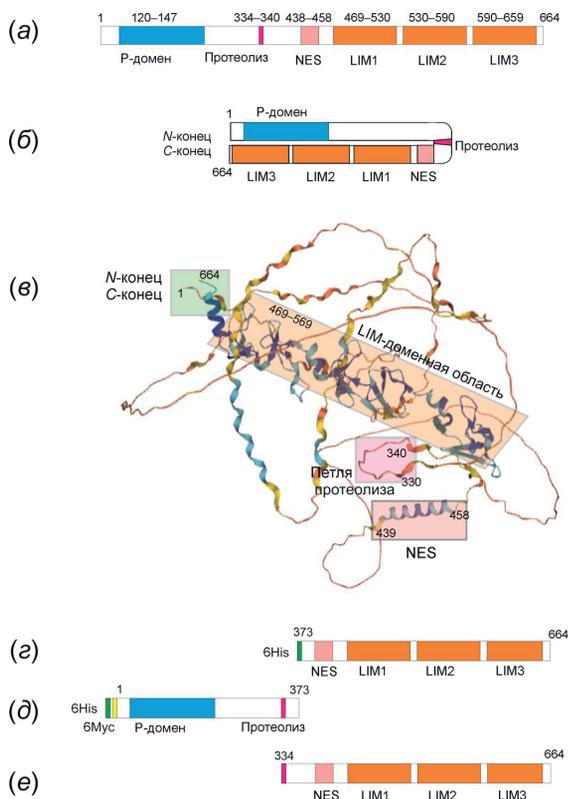
Изучение функционирования высококонсервативных механочувствительных белков, к которым относится зиксин, представляет большой интерес, потому что форма эмбрионов всех животных в период развития создается организованной работой морфогенетических процессов, таких как растяжение, изгибание или сворачивание эмбриональных клеточных пластов, и строго контролируемым переходом клеток к дифференцированному статусу. Консерватизм ранних этапов эмбриогенеза у позвоночных позволяет использовать животных, развитие

которых протекает во внешней среде (эмбрионы *Xenopus laevis*, рыбки *Danio rerio*), в качестве модельных организмов, поэтому исследования с использованием этих моделей имеют не только фундаментальную ценность, но и могут быть полезны в медицинских исследованиях.

Молекула белка зиксина *X. laevis* состоит из 664 а.о. и содержит три консервативных для всех позвоночных региона: пролин-богатую N-концевую область, лейцин-богатый сигнал экспорта из ядра (NES – nuclear export signal) и C-концевой фрагмент с тремя LIM-доменами (рис. 1а) [1].

Сокращения: LIM – от первых букв названий трех белков, у которых был впервые описан данный домен: LIN-11, Isl-1 и MEC-3; NES – сигнал ядерного транспорта (nuclear export signal).

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



**Рис. 1.** Схемы доменной и пространственной организации молекулы зиксина и делеционных конструкций, использованных в работе: (а) – схема доменной структуры полноразмерной молекулы зиксина, сверху обозначены номера аминокислотных остатков для всех представленных на рисунке доменов зиксина: Р-домен 120–147 а.о. (пролин-богатый домен), протеолиз 334–340 а.о. (сайт возможного протеолитического расщепления), NES 438–458 а.о. (сигнал экспорта из ядра) и LIM-доменная область 469–659 а.о.; (б) – схема “закрытой” конформации молекулы зиксина; (в) – пространственная трехмерная структура зиксина, полученная по данным базы PhosphoSitePlus® (<https://www.phosphosite.org>); (г) – схема С-концевого делеционного мутанта, использованного для получения антител к С-зиксину; (д) – схема N-концевого делеционного мутанта, использованного для получения антител к N-зиксину; (е) – схема укороченного по сайту протеолиза делеционного мутанта зиксина ( $\Delta$ зиксина).

N-конец зиксина необходим для взаимодействия с белками цитоскелета, прежде всего с белком, сшивающим актиновые филаменты  $\alpha$ -актинина [2, 3], модулятором сборки актина Epa/VASP [4], цитоскелетными белками LASP-1 и LASP-2 [2]. Пролин-богатые повторы в зиксине похожи на пролин-богатые последовательности в белке ActA внутриклеточной бактерии *Listeria monocytogenes* [5], патогенность которой обусловлена способностью собирать актиновые филаменты на поверхности клетки. Белок ActA

притягивает белки клеточных контактов Epa/VASP на место сборки актина [6]. Благодаря наличию пролин-богатых повторов зиксин, так же как и ActA, является посредником в соединении членов семейства Epa/VASP с актином и участвует в изменениях актинового цитоскелета в эукариотических клетках [7].

NES – лейцин-богатые области, которые участвуют в связывании зиксина с белком CRM1 для выхода из клеточного ядра в цитоплазму [5, 8].

С-концевой участок зиксина содержит три LIM-домена. LIM-домен – это Cys- и His-богатая последовательность длиной 60 а.о. Каждый LIM-домен имеет структуру двух цинковых пальцев. LIM-домены опосредуют специфические взаимодействия белок–белок и белок–ДНК [9]. В работе по участию LIM-доменных белков в механотрансдукции показано, что зиксин связывается своей LIM-доменной областью с F-актином в условиях напряжения и распределяется вдоль стресс-фибрилл [10]. Интересно, что свободная молекула зиксина в цитоплазме имеет “закрытую” конформацию “голова к хвосту”, которая должна быть фосфорилирована по Ser142 с помощью Act2-киназы [11, 12], ацетилована [13, 14] или пальмитилирована [15], чтобы позволить зиксину образовывать комплексы с другими белками (рис. 1б). LIM-домены “открытого” зиксина представляют собой платформу для сборки различных белковых комплексов, прежде всего, ансамбля регуляторов транскрипции [16].

Недавно была опубликована работа по изучению пептидного репертуара в экссудатах ран у млекопитающих [17]. Среди идентифицированных белковых последовательностей были обнаружены два укороченных фрагмента зиксина. Показано, что этот белок подвержен протеолизу по сайту серинпептидазы 1 HtrA с образованием легкой формы 254–572 а.о., которая способна перемещаться в ядро и принимает участие в активации ряда транскрипционных регуляторов, участвующих в повышении адапционных свойств в раневой поверхности. Имеются данные о том, что этот укороченный зиксин продуцируется при высокой плотности клеток и может регулировать количество связанных с раной белков во время заживления кожных ран [17]. Известно также, что синтезированный в условиях бесклеточного синтеза зиксин может быть субстратом для расщепления каспазами *in vitro* при инкубации в бесклеточном апоптотическом лизате S100 и *in vitro* в лизате клеточной линии HEK293 с активированной апоптотической активностью [18].

Примечательно, что на фоне довольно интенсивного изучения функций зиксина в культуре клеток работ, в которых бы исследовались аналогичные функции зиксина в эмбриогенезе, немного. Наиболее интересная работа посвящена изучению роли зиксина в стабилизации синаптических контактов во время развития синапсов в механосенсорных нейронах у круглого червя *Caenorhaditis elegans*. Зиксин из *C. elegans*, как и гомолог позвоночных, содержит *N*-концевую область, богатую пролином, и три тандемно расположенных *C*-концевых LIM-домена. В этой работе неожиданно было показано, что нейронная функция зиксина опосредуется короткой *C*-концевой изоформой, содержащей только LIM-домены, т.е. эта изоформа работает как полнофункциональный белок, способный к трансдукции механических реакций совершенно независимо от *N*-концевого домена [19].

Основной задачей данного исследования было выявление эндогенных изоформ зиксина из *X. laevis* и получение информации об изменениях в их количестве и внутриклеточной локализации, которые могут происходить с этими изоформами в ходе эмбрионального развития.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

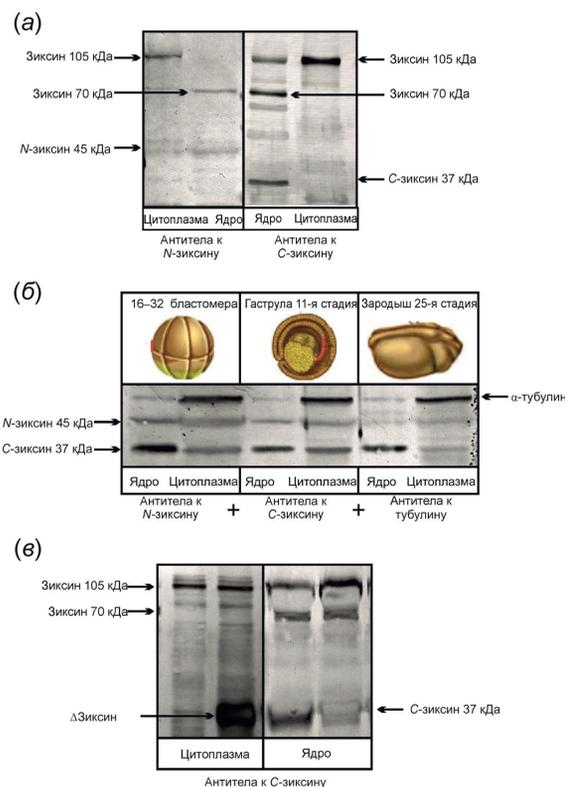
Основной инструмент для детекции эндогенных белков – специфические антитела. Для проведения исследования нами были использованы поликлональные антитела, специфичные к *C*-концевой области зиксина, содержащей последовательность ядерного экспорта NES и три LIM-домена (438–663 а.о.), полученные нами ранее [1] (рис. 1*з*). Эти антитела имеют недостаток – они детектируют только LIM-доменную область зиксина и, соответственно, не могут детектировать его *N*-концевые укороченные изоформы. Поэтому мы получили поликлональные антитела к *N*-концевой пролин-богатой области зиксина (1–373 а.о.), которая участвует во взаимодействии с актинином и другими цитоскелетными белками (рис. 1*а*, схема полноразмерного белка зиксина).

Таким образом, в нашем распоряжении были антитела, которые специфично детектировали *C*-концевой и *N*-концевой фрагменты зиксина.

Зародыши *X. laevis* получали по стандартной отработанной схеме [20]. Зародыши собирали на стадиях от начала дробления (32 бластомера), стадии гаструлы (11-я стадия) до стадии подвижного головастика (26-я стадия) по 20 эмбрионов на стадию и проводили разделение на ядерную и цитоплазматическую фракции для каждой стадии по методике, опубликованной ранее [21]. Из полученных ядерных и цитоплаз-

матических фракций готовили образцы для анализа методом вестерн-блоттинга после разделения в 10%-ном ПААГ по Лэммли. Изоформы зиксина детектировали с использованием поликлональных антител к *N*- и *C*-зиксину, в качестве вторичных антител использовали антикроличьи антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой.

В результате применения антител, специфичных к различным доменам белка зиксина, нам удалось детектировать его изоформы, укороченные с *N*- и *C*-концов, проследить их распределение между ядром и цитоплазмой, а также выявить изменения, происходящие с этими изоформами в ходе развития эмбриона. Прежде всего с использованием имеющихся антител были выявлены полноразмерные формы зиксина с молекулярной массой 105 и 70 кДа, которые детектировались антителами как к *N*-, так и к *C*-доменам (рис. 2*а*). Поскольку расчетная молекулярная



**Рис. 2.** Изоформы зиксина, их стабильность и распределение между ядром и цитоплазмой: (а) – изоформы зиксина, детектируемые антителами к *C*-зиксину и антителами к *N*-зиксину в ядерной и цитоплазматической фракциях клеток эмбрионов на 11-й стадии; (б) – изменения количества укороченных форм зиксина в ходе развития, детекция антителами к *C*-зиксину и антителами к *N*-зиксину, в качестве референсной полосы использовали  $\alpha$ -тубулин; (в) – электрофоретическая подвижность укороченного мутанта  $\Delta$ зиксина (334–664 а.о.) совпадает с эндогенной изоформой *C*-зиксина 37 кДа, детекция антителами к *C*-зиксину.

масса немодифицированного белка без пост-трансляционных модификаций составляет ~70 кДа, то полноразмерный зиксин с массой 105 кДа представляет собой модифицированную изоформу.

Наиболее изученная модификация зиксина млекопитающих – фосфорилирование по аминокислотному остатку Ser 142 [11, 12], кроме этого остатка в молекуле зиксина имеется еще 35 потенциальных участков фосфорилирования (по данным базы PhosphoSitePlus®, <https://www.phosphosite.org>). Поскольку известно, что фосфорилирование сильно замедляет электрофоретическую подвижность белков [22], наиболее вероятная модификация полноразмерной формы – именно фосфорилирование. Есть также работы, в которых показана возможность обратимых модификаций полноразмерного зиксина, таких как пальмитилирование и ацетилирование [13–15]. Возможно, сразу несколько модификаций приводит к замедлению электрофоретической подвижности полноразмерного зиксина.

В результате разделения лизатов из клеток зародышей на ядерную и цитоплазматическую фракции нам удалось показать, что у *X. laevis* модифицированная и немодифицированная формы полноразмерного зиксина имеют различия во внутриклеточной локализации: в цитоплазматической фракции преобладает форма 105 кДа, а в ядерной – 70 кДа (рис. 2а); в ходе развития уровень этих форм существенно не изменяется. При понижении уровня экспрессии зиксина за счет подавления трансляции его мРНК морфолиновыми олигонуклеотидами мы наблюдали уменьшение интенсивности обеих полос в вестерн-блот-анализе лизатов из зародышей на 13-й стадии с использованием антител к С-зиксину (данные не приведены).

При вестерн-блот-анализе лизатов из зародышей на ранних стадиях развития (начиная с 32-клеточного зародыша) мы заметили, что антитела к разным доменам зиксина детектируют более легкие полосы с разной электрофоретической подвижностью. Так, при использовании антител к С-зиксину детектируется полоса с подвижностью в области 37 кДа, а при использовании антител к N-зиксину – полоса в области 45 кДа (рис. 2б).

При этом следует отметить, что перекрестное окрашивание полностью отсутствует, антитела к разным доменам детектируют строго определенные полосы, т.е. можно сказать, что нам удалось “увидеть” две половины молекулы зиксина, которые, вероятнее всего, появились в результате протеолитического расщепления. Наиболее интенсивной полосой, соответствующей укороченному зиксину, была полоса 37 кДа,

которая детектировалась антителами к С-зиксину как в ядерной, так и в цитоплазматической фракции на ранних стадиях, но уже начиная со стадии гаструлы ее интенсивность в цитоплазме резко падала и в ходе дальнейшего развития исчезала, тогда как в ядре она оставалась хорошо детектируемой до стадии подвижного головастика (26-я стадия) (рис. 2б). Поскольку эта полоса окрашивается только антителами к С-зиксину, можно предположить, что это С-концевая, LIM-доменная часть молекулы зиксина, укороченная с N-конца (С-зиксин).

При использовании антител к N-зиксину для детекции в образцах из лизата зародышей на ранних стадиях (32 бластомера) мы наблюдали полосу 45 кДа в ядерной и цитоплазматической фракциях. Эта полоса имеет значительно меньшую интенсивность по сравнению с полосой 37 кДа; в ходе развития полоса сильно ослабевает и к 26-й стадии детектируется очень слабо, особенно в ядре (рис. 2б). При этом полосы 105 и 70 кДа не меняют своей интенсивности в зависимости от стадии. Полоса 45 кДа окрашивается только при использовании антител к N-зиксину и совсем не детектируется антителами к С-зиксину, поэтому можно предположить, что это укороченная с С-конца изоформа (N-зиксин). Во всех экспериментах нормирование количества нанесенного образца проводили по полосе тубулина с использованием моноклональных антител к тубулину (Sigma, США).

Таким образом, нам удалось детектировать две стабильные ядерные изоформы зиксина: полноразмерную немодифицированную (70 кДа) и LIM-доменную С-концевую укороченную изоформу (37 кДа). В небольшом количестве в ядре наблюдается и изоформа 105 кДа, которая слабо детектируется антителами к N-зиксину, что может быть связано с модификациями N-области этой изоформы. Изоформа 105 кДа – мажорная и самая стабильная в цитоплазматической фракции, детектируется двумя типами антител. Изоформа с электрофоретической подвижностью ~45 кДа, которая детектируется антителами к N-зиксину, показала низкую стабильность и хорошо заметна только до стадии гаструлы.

Полученные в работе данные о наличии укороченных форм зиксина в зародышах *X. laevis* коррелируют с данными работы Sabino et al. [17] об обнаружении укороченных С-концевых форм зиксина при исследовании пептидного репертуара в экссудатах ран млекопитающих. Указанный в этой работе сайт протеолитического расщепления серинпептидазой 1 HtrA совпадает с участком 332–338 а.о. для *X. laevis*, имеет высококонсервативную последовательность аминокислот

кислот APGF/GSF/G в районе 332–338 а.о. При анализе пространственной структуры зиксина из *X. laevis* видна структурная петля, которая находится в наружной части молекулы и доступна для протеолиза, а LIM-доменная область расположена в центре молекулы и имеет компактную третичную структуру из чередующихся спиралей и структур типа цинковые пальцы (рис. 1в).

Для того чтобы подтвердить, что протеолиз проходит именно по этому участку, мы создали делеционный мутант Дзиксин (334–664 а.о.) (рис. 1е) и показали, что его электрофоретическая подвижность полностью совпадает с подвижностью эндогенного фрагмента 37 кДа, но экзогенный фрагмент локализуется преимущественно в цитоплазме (рис. 2в), тогда как по результатам многих экспериментов большая часть эндогенного зиксина 37 кДа детектируется в ядерной фракции.

Кроме этого, с использованием специфических антител мы показали, что N-концевой фрагмент зиксина также присутствует в ядре. Это интересный и новый результат, поскольку известно, что N-концевая область взаимодействует с белками цитоскелета – последовательность 16–36 а.о. является сайтом для связывания  $\alpha$ -актина. Поэтому можно было бы предложить гипотезу, что биологическая функция протеолиза молекулы зиксина заключается в диссоциации его LIM-домени от области, связанной с белками цитоскелета, и ее транслокации в ядро, где появляется возможность для взаимодействия с регуляторными факторами транскрипции.

Но по результатам наших исследований N-концевой фрагмент зиксина с массой 45 кДа присутствует в ядре на ранних стадиях развития. Данных о функции N-концевого фрагмента в ядре пока нет в мировой литературе. Считается, что эта область отвечает за взаимодействие с белками цитоскелета, поэтому феномен появления N-концевого фрагмента в ядре на стадиях начала дробления заслуживает дальнейшего изучения.

Не менее интересным и важным для дальнейших исследований представляется обнаружение эндогенного C-концевого, содержащего LIM-домен фрагмента зиксина с массой 37 кДа и его ядерной локализации. Ранее с использованием модели эмбрионов *X. laevis* мы показали, что в эмбриогенезе именно за счет своей LIM-домени области зиксин выполняет важные для развития функции: 1) модулирует активность регулятора передних отделов мозга, транскрипционного фактора *Xanf1* [23, 24]; 2) регулирует активность сигнальных путей SHH (sonic hedgehog) [25]; 3) оказывает влияние на стабильность мРНК маркеров плюрипотентности семей-

ства *Pou 5F3*, гомологов известного фактора стволовых клеток *Oct 4* и рецептора ретиноидов *Rxrg* [26, 27]. Во всех работах с использованием методов двугибридной дрожжевой системы и коиммунопреципитации мы доказали, что транскрипционные факторы, такие как *Xanf1*, *Gli1*, *Zic1* и *Ybx1*, взаимодействуют именно с LIM-домениной областью, причем для всех приведенных белков было показано, что взаимодействие с полноразмерным зиксином значительно слабее, чем взаимодействие с его LIM-домениным фрагментом. Для коиммунопреципитации мы использовали экзогенный C-концевой фрагмент, несущий пептидные метки для возможности соосаждения белковых комплексов с применением смол с иммобилизованными коммерческими антителами. Экспрессия меченых пептидами белков в клетках эмбрионов достигается за счет микроинъекций синтетических мРНК в зародыши на стадии первого деления, и количество таких экзогенных белков превышает уровень эндогенных. Поэтому ослабление связывания исследуемых факторов с эндогенным полноразмерным зиксином не вызывало у нас сомнений. Идентификация укороченного эндогенного C-концевого фрагмента, содержащего LIM-домены, ставит вопрос о том, какая (полноразмерная или укороченная) изоформа зиксина участвует во взаимодействии с найденными ранее партнерами – транскрипционными факторами, и может ли укороченная изоформа модулировать активность соответствующих сигнальных каскадов.

Поскольку в настоящей работе мы получили уникальные данные о внутриклеточном распределении модифицированной и немодифицированной полноразмерной форм зиксина, а также об укороченных изоформах зиксина *X. laevis*, необходимо дальнейшее изучение возникновения и возможного влияния этих изоформ на генную экспрессию в процессе эмбриогенеза.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Получение моноспецифичных антител к N- и C-фрагментам зиксина.** Антитела к C-концевому фрагменту зиксина были получены нами ранее по методике, представленной в работе Martynova et al. [1].

Антисыворотка против N-концевого фрагмента зиксина (UniProt: A5H447) наработана в результате иммунизации кролика укороченным белком, содержащим 1–373 а.о. Соответствующую вставку кДНК клонировали в вектор pQE80 (Qiagen, США) и экспрессировали гибридный белок, несущий шесть остатков His и Мус-пептид

на *N*-конце, в *Escherichia coli* DH-5 $\alpha$ . Для иммунизации экспрессированный в бактериальной системе белок очищали с помощью Ni-NTA-хроматографии и детектировали количество и степень очистки при помощи иммуноблоттинга с антителами к 6His и Мус-пептиду, конъюгированными с щелочной фосфатазой.

Иммунизацию кролика (здоровая самка, 1 год, вес 1.8 кг, Питомник лабораторных животных – Филиал “Столбовая”, Россия) проводили по методике Martynova et al. [1] с использованием полного и неполного адъюванта Фрейнда (Sigma, США).

Для получения моноспецифических антител была создана аффинная колонка на основе BrCN-сефарозы (Sigma, США) с иммобилизованным гибридным с GST (глутатион-S-трансфераза, глутатион-связывающий белок) *N*-фрагментом зиксина.

Для приготовления такой аффинной колонки последовательность, кодирующую *N*-домен зиксина (1–373 а.о.), клонировали в вектор pGEX-4T-1 (Pharmacia, Швеция). Экспрессию белка GST-*N*-зиксина осуществляли в *E. coli* BL21. Выделение гибридного с GST белка из бактериального лизата проводили при помощи аффинной хроматографии на глутатион-агарозе, очищенный белок использовали для ковалентного сшивания с BrCN-сефарозой (Sigma, США). Очистку моноспецифических антител на аффинной колонке проводили по стандартной методике Martynova et al. [1].

**Получение зародышей, разделение лизата на ядерную и цитоплазматическую фракции и подготовка образцов для вестерн-блот-анализа.** Зародышей *X. laevis* получали в результате оплодотворения *in vitro* по методике, разработанной ранее [1]. Зародышей инкубировали в растворе 0.1 MMR (модифицированный раствор Рингера для культивирования зародышей амфибий (0.1 MMR): 0.1 M NaCl, 2.0 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 2 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 5 mM HEPES, pH 7.4) до стадии 32 бластомера, стадии гастрюлы (12 стадия), стадии подвижного головастика (26-я стадия). На каждой стадии отбирали по 20 зародышей, половину зародышей использовали для приготовления лизата в буфере для коиммунопреципитации (1× буфер (pH 7.2–7.4): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% Triton-X100). Зародыши гомогенизировали пипетированием, полученный грубый лизат центрифугировали 30 мин при 15 000 g, отбирали супернатант и готовили образцы для электрофореза по стандартной методике. Другую половину зародышей исполь-

зовали для разделения лизата на ядерную и цитоплазматическую фракции по ранее опубликованной методике [21] с небольшой модификацией – ядра после очистки в 0.8 M сахарозе растворяли в буфере для коиммунопреципитации и центрифугировали 30 мин при 16 000 g и 4°C. Супернатант использовали для приготовления образцов для электрофореза.

**SDS-PAGE.** Образцы анализировали с помощью SDS-PAGE в 10%-ных гелях по методу Лэммли и подвергали электроблоттингу на PVDF-мембране (Millipore Corp. Inc. Франция). В качестве первичных антител использовали моноспецифичные поликлональные антитела кролика к *C*- или *N*-зиксину и моноклональные антитела к  $\alpha$ -тубулину (Sigma, США) в качестве референсных антител. В качестве вторичных антител использовали козий антикроличий Fab-фрагмент антитела, конъюгированный с щелочной фосфатазой (Sigma, США), и антимишинный Fab-фрагмент антитела, конъюгированный с щелочной фосфатазой (Sigma, США). Для детекции использовали стабилизированный субстрат для щелочной фосфатазы Western Blue (Promega, США). Результаты электрофореза и блоттинга оценивали визуально по окраске колометрического субстрата. Эксперименты по анализу изменений в экспрессии и локализации изоформ зиксина на проявленных специфическими антителами PVDF-мембранах проводили в более чем трехкратной повторности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе мы обнаружили, что зиксин из *X. laevis* имеет несколько изоформ: помимо полноразмерного модифицированного белка с молекулярной массой ~105 кДа мы детектировали немодифицированную форму зиксина с приблизительно молекулярной массой 70 кДа и две укороченные формы 45 и 37 кДа. Мы установили, что количество и внутриклеточное распределение коротких форм зависит от стадии развития эмбриона. Показано, что на начальных стадиях развития количество укороченных ядерных форм 45 и 37 кДа увеличено, но в процессе гастрюляции и нейруляции, когда начинается движение клеточных слоев и возникают поля механических напряжений, преобладает цитоплазматическая форма зиксина 105 кДа и ядерные формы 70 и 37 кДа. В результате проведенной работы впервые получен важный блок данных об изменении уровня и локализации изоформ механочувствительного белка зиксина в эмбриональном развитии, что может быть связующим звеном в передаче генному аппарату механических напряжений, которые

возникают в эктодерме и мезодерме эмбриона в ходе формирования его осевых структур.

### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00227 (<https://rscf.ru/project/23-25-00227/>).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Эксперименты на животных одобрены комиссией Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН по контролю и использованию лабораторных животных (протокол-заявка, рег. № 249).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Martynova N.Y., Eroshkin F.M., Ermolina L.V., Ermakova G.V., Korotaeva A.L., Smurova K.M., Gyoeva F.K., Zاراisky A.G.* // *Dev. Dyn.* 2008. V. 237. P. 736–749.  
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21471>
2. *Li B., Zhuang L., Trueb B.* // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 20401–20410.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M310304200>
3. *Reinhard M., Zumbunn J., Jaquemar D., Kuhn M., Walter U., Trueb B.* // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 13410–13418.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.19.13410>
4. *Steele A.N., Sumida G.M., Yamada S.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012. V. 422. P. 653–657.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.046>
5. *Beckerle M.C.* // *Bioessays.* 1997. V. 19. P. 949–957.  
<https://doi.org/10.1002/bies.950191104>
6. *Fradelizi J., Noireaux V., Plastino J., Menichi B., Louvard D., Sykes C., Golsteyn R.M., Friederich E.* // *Nat. Cell Biol.* 2001. V. 3. P. 699–707.  
<https://doi.org/10.1038/35087009>
7. *Oldenburg J., van der Krogt G., Twiss F., Bongaarts A., Habani Y., Slotman J.A., Houtsmuller A., Huveneers S., de Rooij J.* // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 17225.  
<https://doi.org/10.1038/srep17225>
8. *Dong X., Biswas A., Süel K.E., Jackson L.K., Martinez R., Gu H., Chook Y.M.* // *Nature.* 2009. V. 458. P. 1136–1141.  
<https://doi.org/10.1038/nature07975>
9. *Kadmas J.L., Beckerle M.C.* // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004. V. 5. P. 920–931.  
<https://doi.org/10.1038/nrm1499>
10. *Sun X.M., Bowman A., Priestman M., Bertaux F., Martinez-Segura A., Tang W., Whilding C., Dormann D., Shahrezaei V., Marguerat S.* // *Curr. Biol.* 2020. V. 30. P. 1217–1230.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.01.053>
11. *Moody J.D., Grange J., Ascione M.P., Boothe D., Bushnell E., Hansen M.D.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 378. P. 625–628.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.11.100>
12. *Call G.S., Chung J.Y., Davis J.A., Price B.D., Primavera T.S., Thomson N.C., Wagner M.V., Hansen M.D.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. V. 404. P. 780–784.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.058>
13. *Fujita Y., Yamaguchi A., Hata K., Endo M., Yamaguchi N., Yamashita T.* // *BMC Cell Biol.* 2009. V. 10. P. 6.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-6>
14. *Zhao Y., Yue S., Zhou X., Guo J., Ma S., Chen Q.* // *J. Biol. Chem.* 2022. V. 298. P. 101776.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101776>
15. *Oku S., Takahashi N., Fukata Y., Fukata M.* // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 19816–19829.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.431676>
16. *Wang Y.X., Wang D.Y., Guo Y.C., Guo J.* // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2019. V. 23. P. 413–425.  
[https://doi.org/10.26355/eurrev\\_201901\\_16790](https://doi.org/10.26355/eurrev_201901_16790)
17. *Sabino F., Madzharova E., Auf dem Keller U.* // *Cell Death Dis.* 2020. V. 11. P. 674.  
<https://doi.org/10.1038/s41419-020-02883-2>
18. *Chan C.B., Liu X., Tang X., Fu H., Ye K.* // *Cell Death Different.* 2007. V. 14. P. 1688–1699.  
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402179>
19. *Lecroisey C., Brouilly N., Qadota H., Mariol M.C., Rochette N.C., Martin E., Benian G.M., Ségalat L., Mounier N., Gieseler K.* // *Mol. Biol. Cell.* 2013. V. 24. P. 1232–1249.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.e12-09-0679>
20. *Martynova N.Y., Parshina E.A., Ermolina L.V., Zараisky A.G.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. V. 504. P. 251–256.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.164>
21. *Martynova N.Y., Parshina E.A., Zараisky A.G.* // *STAR Protoc.* 2021. V. 2. P. 100449.  
<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100449>
22. *Lee C.R., Park Y.H., Min H., Kim Y.R., Seok Y.J.* // *J. Microbiol.* 2019. V. 57. P. 93–100.  
<https://doi.org/10.1007/s12275-019-9021-y>

23. Martynova N.Y., Parshina E.A., Zاراisky A.G. // FEBS J. 2023. V. 290. P. 66–72. <https://doi.org/10.1111/febs.16308>
24. Martynova N.Y., Ermolina L.V., Eroshkin F.M., Gioeva F.K., Zاراisky A.G. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2008. V. 34. P. 513–516.
25. 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>
26. 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>
27. 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>

## Isoforms of the Cytoskeletal LIM-Domain Protein Zyxin in the Early Embryogenesis of *Xenopus laevis*

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

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

\* Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia

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

Zyxin is a conserved mechanosensitive LIM-domain protein that regulates the assembly of F-actin filaments at cell junctions. At the same time, under mechanical stress, it can move from focal adhesions to stress fibrils and into the nucleus and affect gene expression. In *Xenopus laevis* embryonic cells, western blots with antibodies against Zyxin's N-terminal and C-terminal LIM-domain regions revealed two full-length and two short isoforms. The intracellular localization of these isoforms and the number depending on the stage of embryo development were determined. According to our study, full forms with different electrophoretic mobility are localized differently in the cell, and the shortest isoform containing LIM-domains is stable during development, mainly located in the nucleus, and participates in gene expression regulation. This study may be of great value to understanding how the LIM-domain mechanotransducer proteins jointly influence morphogenesis and differentiation in vertebrates at early stages of development.

**Keywords:** *embryogenesis, protein isoforms, development, intracellular localization, Zyxin, modifications, proteolysis*