

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки**

**Государственный научный центр Российской Федерации  
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

*им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова*

*Российской академии наук*

**(ГНЦ ИБХ РАН)**

*На правах рукописи*

Мартынова Наталья Юрьевна

**Белковые комплексы с участием цитоскелетного  
белка зиксина в процессах эмбриональной  
дифференцировки и морфогенеза**

Специальность – 1.5.3 – молекулярная биология

Автореферат на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Москва, 2026

**Работа выполнена** в Лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН)

**Научный консультант:**

доктор биологических наук, профессор **Зарайский Андрей Георгиевич**

**Официальные оппоненты:**

**Глушанкова Наталия Александровна**, доктор биологических наук, заведующая лабораторией цитоскелетных механизмов метастазирования ФГБУ Министерства здравоохранения Российской Федерации Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина.

**Шидловский Юлий Валерьевич**, доктор биологических наук, профессор РАН, главный научный сотрудник, заведующий Лабораторией регуляции экспрессии генов в развитии, ФГБУН Институт биологии гена РАН

**Лябин Дмитрий Николаевич**, доктор биологических наук, руководитель группы регуляции биосинтеза белка ФГБУН Институт белка Российской академии наук.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова».

**Защита состоится 30 сентября 2026 года в 11 часов** на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при ГНЦ ИБХ РАН по адресу: 119997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru) ГНЦ ИБХ РАН.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2026 г.



Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук  
**Олейников Владимир Александрович**

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность исследования.**

Эмбриональное развитие представляет собой сложно организованную последовательность взаимосвязанных структурных преобразований и событий на молекулярном уровне. Исследования последних десятилетий выявили множество генов, которые определяют судьбу клеток в развитии. Значительная часть этих генов кодирует эволюционно консервативные факторы транскрипции, а также белки, модулирующие их активность. Консерватизм ранних этапов эмбриогенеза позвоночных позволяет использовать виды с развитием во внешней среде, таких как шпорцевая лягушка (*Xenopus laevis*) или рыбка Данио (*Danio rerio*), в качестве модельных организмов для изучения фундаментальных механизмов, обеспечивающих точную координацию программ клеточной дифференцировки, протекающих одновременно в разных частях зародыша.

Начальные этапы дифференцировки тесно связаны с морфогенетическими движениями клеток в ходе гаструляции, когда формируются основные зародышевые листки. На этой стадии ключевую регуляторную роль играют комплексы адгезивных белков и ассоциированные с ними компоненты цитоскелета.

Зиксин – многофункциональный цитоскелетный белок, регулирующий сборку актиновых микрофиламентов на клеточных контактах, который при определенных условиях способен транспортироваться в ядро и влиять на экспрессию генов. Таким образом, зиксин потенциально может участвовать в передаче сигнала от клеточных контактов к генетическому аппарату. Известно, что зиксин выступает в качестве белковой платформы для стабилизации мультипротеиновых комплексов, участвуя в формировании гетерогенных комбинаций транскрипционных факторов, киназ, фосфатаз и убиквитин-лигаз, которые обеспечивают тонкую регуляцию экспрессии генов. Комплексы с участием зиксина модулируют активность ряда ключевых сигнальных путей как за счет индукции посттрансляционных модификаций, так и путем изменения внутриклеточной локализации их компонентов. Примечательно, что, несмотря на интенсивное изучение биологических и молекулярных функций зиксина в качестве онкомаркера в культуре клеток, работ, посвященных его роли в эмбриогенезе, существенно меньше. Между тем, исследование функционирования зиксина в условиях целого развивающегося

орган изма является актуальной задачей ввиду его возможной вовлеченности в регуляцию целого ряда процессов, от раннего развития до спецификации клеточных типов.

Наиболее актуальными направлениями представленной работы являются:

1. Участие зиксина в формировании и дорсо-вентральной разметки раннего зачатка нервной трубки у эмбрионов шпорцевой лягушки.
2. Влияние зиксина на формирование передних отделов центральной нервной системы, включая передний мозг и глаза.
3. Изучение роли зиксина в регуляции пусковых механизмов клеточной дифференцировки и формирования осевых структур зародыша.

Исследование функций механочувствительных белков, к которым относится зиксин, представляет исключительную важность для эмбриогенеза, поскольку форма эмбрионов в ходе развития создается скоординированными морфогенетическими процессами (растяжение, изгибание, инвагинация клеточных пластов) и строго контролируемым переходом клеток к дифференцированному состоянию. Знания о молекулярных механизмах, регулируемых механочувствительными белками, имеют не только фундаментальную ценность для понимания принципов развития многоклеточных животных, но и потенциально важны для биомедицинских приложений. Нарушения процессинга и локализации таких белков играют существенную роль в патогенезе ряда заболеваний, прежде всего онкологических и сердечно-сосудистых. Кроме того, эти данные актуальны для биоинженерии и регенеративной медицины, где стоит задача создания тканевых структур заданной геометрии.

Таким образом, данные, полученные в настоящей работе, важны для углубленного понимания молекулярных механизмов формирования отделов нервной системы, путей трансдукции механических стимулов в изменения генетической программы, а также роли клеточной адгезии и миграции в процессах дифференцировки и морфогенеза в норме.

**Цель и задачи исследования.** Целью данной работы является изучение механизмов, связывающих морфогенез и экспрессию генов в ходе

эмбрионального развития, на примере многофункционального цитоскелетного белка зиксина.

Основная задача – исследование функций белка зиксина в регуляции раннего развития позвоночных. В рамках поставленной цели были сформулированы следующие конкретные задачи:

1. Поиск и характеристика белковых партнеров зиксина *Xenopus laevis*, анализ их биологических функций и картирование доменов взаимодействия.
2. Поиск генов-мишеней, на экспрессию которых влияет зиксин.
3. Исследование влияния зиксина на клеточную дифференцировку через регуляцию экспрессии факторов, поддерживающих стволовой статус эмбриональных клеток.
4. Изучение влияния зиксина на активность ключевых сигнальных каскадов, определяющих разметку и формирование осевых структур зародыша.

#### **Научная новизна работы.**

Научная новизна диссертации определяется следующими положениями:

1. Впервые идентифицирован, клонирован и охарактеризован белок зиксин у шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*). Определена его полная нуклеотидная и аминокислотная последовательность, проведен сравнительный анализ с гомологами у других позвоночных, выявлены консервативные домены, изучены временной и пространственный профили его экспрессии.
2. Впервые показана способность зиксина модулировать активность транскрипционного репрессора *Xanf1* на ранних стадиях формирования структур переднего мозга.
3. Впервые обнаружено физическое и функциональное взаимодействие зиксина с тремя ключевыми компонентами сигнального пути Hedgehog: транскрипционными факторами *Gli1* и *Zic1*, а также трансмембранным рецептором *Patched2* (*Ptc2*). Продемонстрирована роль зиксина в тонкой настройке ответа генов-мишеней этого пути.

4. Впервые раскрыт механизм, посредством которого зиксин участвует в регуляции начальных этапов дифференцировки, влияя на стабильность мРНК генов, ответственных за плюрипотентность (семейство *pou5f3*). Установлено, что этот эффект опосредован взаимодействием зиксина с Y-бокс-связывающим белком 1 (Ybx1), что препятствует стабилизирующему связыванию последнего с мРНК-мишенями. Полученные данные были подтверждены на дополнительных модельных системах: эмбрионах *Danio rerio* и клеточной линии НЕК 293 эмбриональной почки человека.

5. Впервые показано влияние зиксина на сигнальный каскад ретиноевой кислоты, важный для антеро-постериорной разметки развивающегося эмбриона.

### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Теоретическая значимость работы заключается в углублении понимания молекулярных основ, связывающих морфогенетические движения, механические силы и генетическую программу развития. На молекулярном уровне эта связь реализуется, в частности, через белки-«шаттлы», перемещающиеся между цитоскелетом и ядром. К таким белкам относится зиксин, способный регулировать фундаментальные клеточные процессы: дифференцировку, пролиферацию, миграцию, адгезию и апоптоз. Таким образом, изучение функций зиксина имеет фундаментальное значение для биологии развития.

Практическая значимость обусловлена тем, что полученные знания о регуляции ключевых сигнальных путей (Hedgehog, ретиноевой кислоты) и поддержания плюрипотентности с участием зиксина создают основу для разработки новых подходов в регенеративной медицине и тканевой инженерии. Понимание этих механизмов может найти применение в управлении морфогенетическими процессами.

### **Методология и методы исследования.**

Основные методы работы были направлены на изучение белковых взаимодействий, в которых зиксин выступает в качестве платформы для сборки функциональных комплексов. Ведущим модельным организмом служили эмбрионы шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, дополнительными – эмбрионы рыбки Данио (*Danio rerio*) и линия клеток эмбриональной почки человека НЕК293. Модель *X. laevis* позволяет целенаправленно модулировать

уровень экспрессии генов с помощью микроинъекций синтетических мРНК и антисмысловых морфолино-олигонуклеотидов и детектировать последствия таких манипуляций на молекулярном, клеточном, тканевом и организменном уровнях. Поиск белковых партнеров зиксина проводили с использованием дрожжевой двугибридной системы. Анализ посттрансляционных модификаций зиксина, а также белков, взаимодействующих с ним *in vivo* в клетках эмбрионов проводили с использованием хромато-масс-спектрометрии. Для выявления его генетических мишеней применяли высокопроизводительное секвенирование транскриптома (RNA-seq). Для подтверждения данных использовали широкий спектр методов молекулярной биологии и биологии развития: количественную ПЦР в реальном времени (qRT-PCR), иммуноблоттинг (Western blot), гибридизацию *in situ* на целых зародышах (WISH), иммуногистохимию, анализ белок-белковых (коиммунопреципитация, аффинная хроматография *in vitro* pull-down) и белок-ДНК взаимодействий (EMSA), а также люциферазные репортерные системы для изучения активности промоторов.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

Цитоскелетный LIM-доменный белок зиксин, впервые идентифицированный у шпорцевой лягушки, является модулятором ключевых сигнальных путей эмбриогенеза и влияет на следующие процессы развития:

1. Формирование переднего мозга — за счет прямого связывания с транскрипционным репрессором *Xanf1* и ослабления его активности в клетках зачатка переднего мозга.
2. Дорсо-вентральная разметка нервной трубки — посредством ингибирования Hedgehog-сигнального каскада, что реализуется через способность зиксина взаимодействовать с тремя ключевыми компонентами этого пути: рецептором *Ptc2* и эффекторами *Gli1* и *Zic1*.
3. Регуляция клеточной дифференцировки — через контроль стабильности мРНК генов семейства *rou5f3*, ответственных за плюрипотентность. Механизм основан на взаимодействии зиксина с РНК-связывающим белком *Ybx1*, что препятствует стабилизации мРНК *rou5f3* и ускоряет ее деградацию, способствуя выходу клеток из стволового состояния.

4. Антеро-постериорная разметка — за счет участия в сигнальных каскадах ретиноевой кислоты. Зиксин регулирует экспрессию рецепторов ретиноевой кислоты по механизму, сходному с контролем генов *rou5f3*.

5. Механочувствительная передача сигналов — зиксин выполняет функцию передатчика, сопрягающего начало морфогенетических движений с репрессией генов плюрипотентности (включая *rou5f3*) и инициацией дифференцировки.

### **Апробация диссертации и публикации**

Материалы диссертации опубликованы в 48 статьях в рецензируемых журналах, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus, включены в состав 3 патентов. Результаты работы были представлены в виде приглашенных докладов и стендовых сообщений на 5 всероссийских и 6 международных конференциях.

### **Структура и объем диссертации**

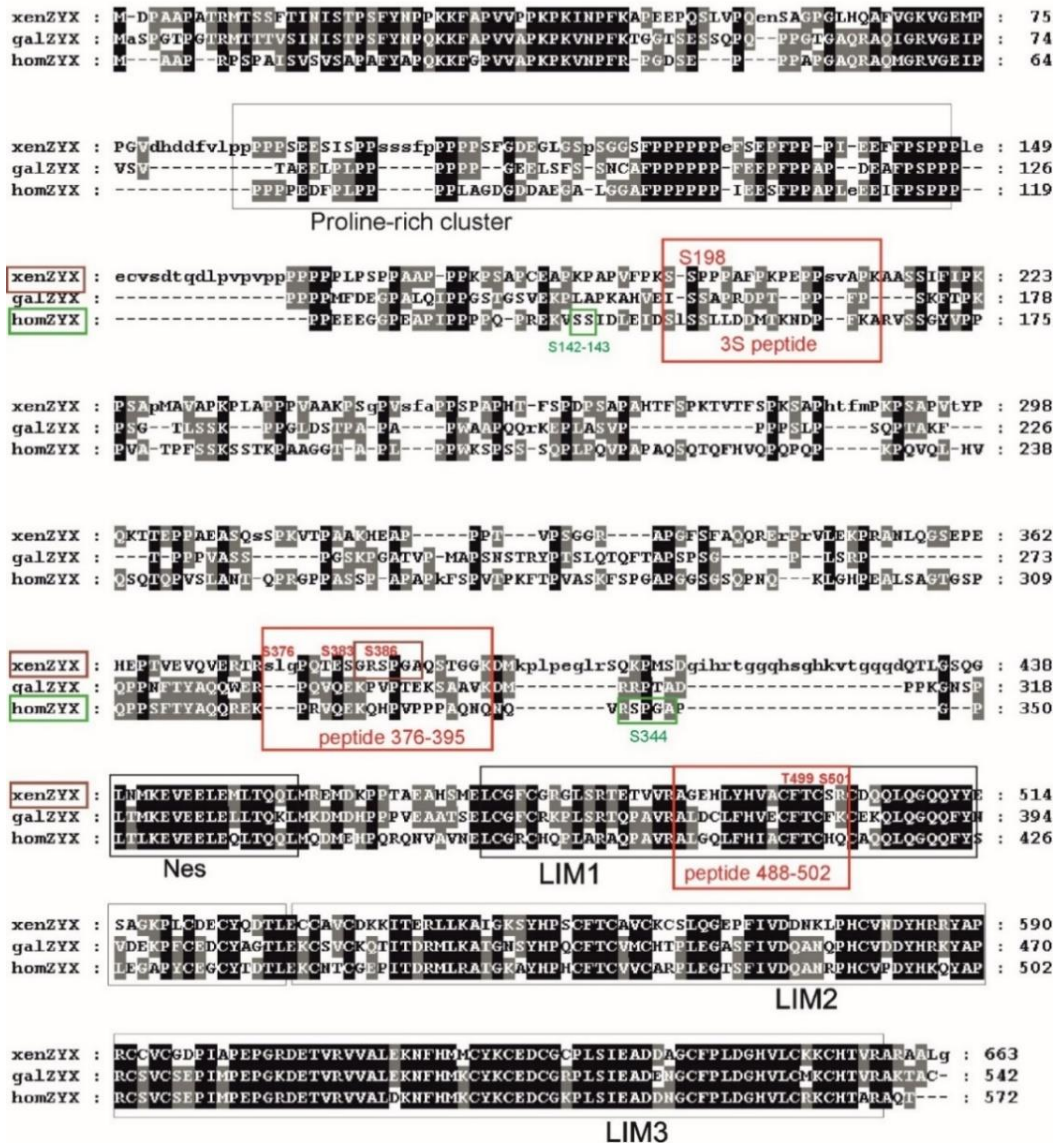
Диссертация состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературных данных, Результаты, Обсуждение результатов, Материалы и методы исследования, Выводы, Список цитированной литературы, Приложения 1-5. Текст диссертации изложен на 402 страницах машинописного текста, содержит 82 Рисунка и 8 Таблиц. Список цитированной литературы включает 449 работ.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. Идентификация и характеристика зиксина *Xenopus laevis***

В ходе поиска белков-партнеров транскрипционного фактора, регулятора развития переднего мозга, репрессора *Xanfl* методом дрожжевой двугибридной системы впервые идентифицирован белок зиксин у шпорцевой лягушки *X. laevis* (*Xenopus laevis*). Была клонирована его полноразмерная кДНК (1992 п.н.), кодирующая белок из 664 аминокислот с расчетной молекулярной массой ~70 кДа (депонирована в GenBank под номером EF051627). Сравнительный анализ филогенетики и доменной архитектуры с использованием программного пакета ClustalW2 подтвердил принадлежность клонированного белка к семейству зиксинов и выявил высокую

эволюционную консервативность: С-концевой регион (а.о. 373–664), содержащий три LIM-домена и сигнал ядерного экспорта (NES), демонстрирует гомологию ~80% с ортологами человека и курицы (Рисунок 1).



**Рисунок 1.** Сравнительный анализ белка зиксина: последовательности зиксина у *X. laevis* (*xenZYX*), курицы (*galZYX*) и человека (*HomZYX*). Участки с высокой степенью гомологии выделены черным цветом, участки с частичной гомологией — серым. Общая доменная структура белков консервативна. Уникальные N-концевые последовательности зиксина *X. laevis*, отсутствующие у гомологов, обозначены строчными буквами (в соответствующих позициях для курицы и человека указаны прочерки). Картирование и сравнительный анализ сайтов фосфорилирования зиксина. Пептиды, идентифицированные как фосфорилированные в модели *Xenopus*, выделены красным цветом. Соответствующие сайты фосфорилирования и аминокислотные остатки в зиксине человека отмечены и подписаны зеленым цветом.

## 1.1 Масс-спектрометрический анализ посттрансляционных модификаций зиксина

Методами хромато-масс-спектрометрии и количественной фосфопротеомики проведен всесторонний анализ посттрансляционных модификаций зиксина *in vivo*. Помимо N-концевого ацетилирования, идентифицирована сложная картина фосфорилирования, включающая стадийно-регулируемые сайты. Было показано, что уровень фосфорилирования консервативного N-концевого сайта (Ser198, гомолог Ser142 человека) максимален на гастреле и критически важен для ядерной транслокации зиксина.

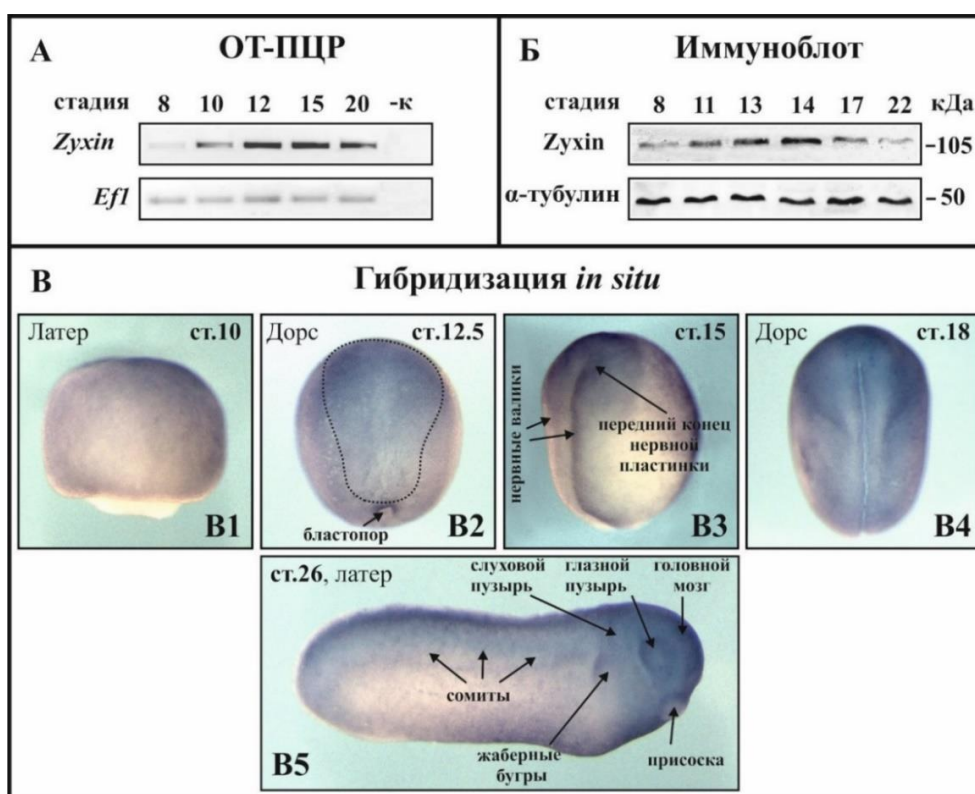
Обнаружены как конститутивные (Ser376, Ser383), так и стадийно-исчезающие (Ser386) фосфосайты в центральном домене. Фосфорилирование Ser 386 происходит в высококонсервативном митотическом мотиве (RSPGA), что указывает его возможную роль в регуляции клеточного цикла (Рисунок 1).

Впервые обнаружено двойное фосфорилирование Thr499/Ser501 внутри первого LIM-домена с крайне низкой стехиометрией ( $\sim 10^{-5}$ ). LIM-домены представляют собой цинк-пальцевые структуры, традиционно рассматриваемые как конститутивно стабильные платформы для белок-белковых взаимодействий. Обнаружение фосфорилирования внутри такой структуры, пусть даже низкостехиометрического, указывает на принципиально новую возможность — прямую аллостерическую регуляцию функции LIM-домена через его собственное фосфорилирование. Это может модулировать аффинность LIM-домена к его партнерам в специфических субпопуляциях клеток или в узких временных окнах, добавляя еще один уровень тонкой настройки к регуляции активности зиксина. В совокупности, полученные данные формируют представление о «коде фосфорилирования» зиксина, где комбинация модификаций в разных доменах (N-концевом, центральном, LIM-доменах) определяет его конформацию, субклеточную локализацию и набор партнеров в конкретный момент развития.

## 1.2 Пространственно-временная динамика экспрессии гена *zikin*

Комплексный анализ экспрессии гена *zikin* на уровне мРНК: ОТ-ПЦР, гибридизация WISH (*in situ*) и белка (иммуноблоттинг) установил его пространственно-временной профиль в раннем эмбриогенезе (Рисунок 2). Показано, что зиксин характеризуется небольшим запасом материнских

транскриптов и белка и резкой зиготической активацией в период гаструляции с пиком экспрессии на стадии нейруляции (стадии 13-15), что коррелирует с фазой активных морфогенетических движений. Пространственный анализ выявил специфическую область максимальной экспрессии в краниальной эктодерме и переднем отделе формирующейся нервной пластинки, что впервые указывает на потенциальную роль зиксина в морфогенезе переднего мозга у позвоночных. Область экспрессии гена *zuxin* не имеет резких границ, что характерно для генов, кодирующих универсальные цитоскелетные регуляторы, необходимые для поддержания клеточной адгезии и организации актинового цитоскелета.



**Рисунок 2.** Пространственно-временной профиль экспрессии гена *zuxin* в ходе эмбриогенеза *X. laevis*. **А.** Динамика транскрипции гена *zuxin* в ходе развития. Результаты анализа методом ОТ-ПЦР. Используются праймеры к кДНК *zuxin* и тотальная РНК, выделенная из зародышей на указанных стадиях развития. Контроль «-к»: реакция без обратной транскриптазы. В качестве референсного гена показана экспрессия *EF-1 $\alpha$* . **Б.** Динамика накопления белка зиксина. Иммуноблот-анализ лизатов зародышей на соответствующих стадиях развития с использованием антител против зиксина. В качестве контроля нагрузки использованы антитела к  $\alpha$ -тубулину. **В.** Область пространственной экспрессии мРНК *zuxin*, выявленный методом гибридизации *in situ*. Темно-синее окрашивание указывает на локализацию транскриптов гена *zuxin*. **В1.** Стадия ранней гаструлы (ст.10). **В2.** Стадия маленькой желточной пробки (ст.12.5). Пунктирная линия обозначает границы закладки нервной пластинки. **В3.** Стадия ранних нервных валиков (ст.15), дорсальный вид. **В4.**

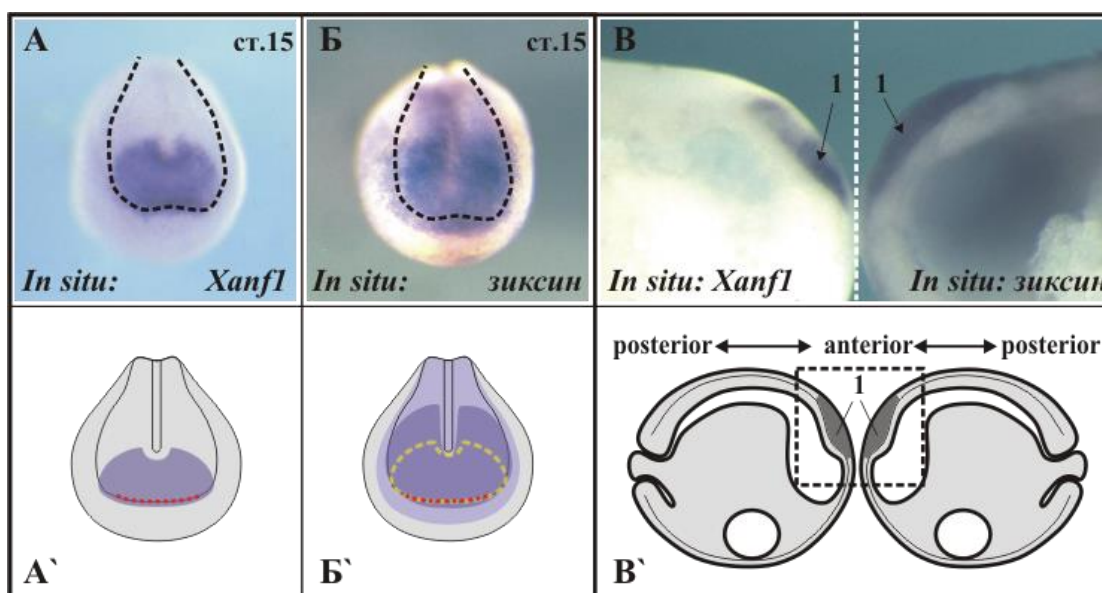
Стадия нервного желобка (ст.18), дорсальный вид. **В5.** Стадия хвостовой почки (ст.26), латеральный вид.

## 2.Подтверждение взаимодействия зиксина с транскрипционным репрессором *Xanf1* и его функционального значение

В ходе исследования всесторонне изучено взаимодействие между цитоскелетным белком зиксином и ключевым репрессором развития переднего мозга *Xanf1* и получены доказательства его функциональной значимости

### 2.1 Совпадение пространственных паттернов экспрессии генов *zuxin* и *xanf1*

Первым свидетельством возможности взаимодействия *in vivo* послужил сравнительный анализ локализации транскриптов генов *zuxin* и *xanf1* методом гибридизации *in situ* на целых зародышах (WISH). На стадии средней нейрулы (ст. 15) было выявлено существенное перекрытие их областей экспрессии в краниальной части нервной пластинки. Характерная трапециевидная зона экспрессии *xanf1* полностью располагалась в области максимального сигнала *zuxin*, что указывало на возможность ко-экспрессии и взаимодействия их белковых продуктов в клетках-предшественниках переднего мозга (Рисунок 3)



**Рисунок 3.** Локализация транскриптов *xanf1* (А) и *зиксина* (Б) в эмбрионах *X. laevis* на стадии нейрулы (ст. 15). Пунктирные линии указывают контуры нервной пластинки; вид спереди с дорсальной стороны. А'–Б'. Диаграммы зон экспрессии в эмбрионе с желтой пунктирной линией для зоны экспрессии *xanf1* и красной — для переднего края нервной пластинки. В. Продольные срезы одного и того же эмбриона после *in situ* гибридизации с антисмысловыми зондами к мРНК *xanf1* (слева) и

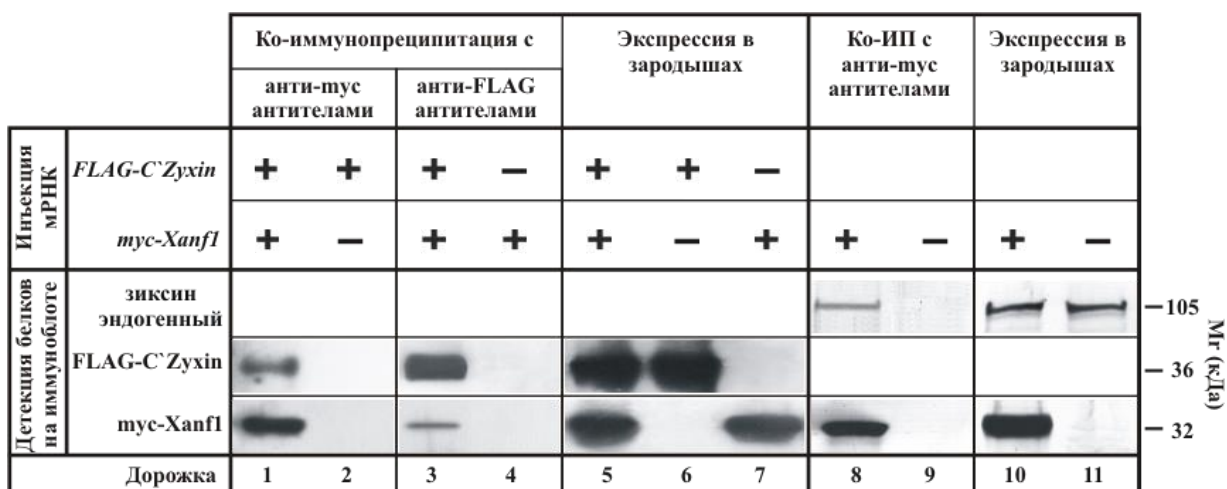
зиксину (справа); 1 — передний отдел нервной пластинки. В'. Схема эмбриона в разрезе.

## 2.2 Доказательство физического взаимодействия зиксина и *Xanf1* *in vivo* и *in vitro*

Образование белкового комплекса зиксина и *Xanf1* было подтверждено независимыми методами:

1-Ко-иммунопреципитацией из лизатов эмбрионов, инъецированных синтетическими РНК, кодирующими меченые версии белков (FLAG-зиксин и мус-*Xanf1*) однозначно показала их способность к специфичному связыванию *in vivo*. Важным подтверждением физиологической значимости стало обнаружение комплекса эндогенного полноразмерного зиксина с экзогенным мус-*Xanf1* (Рисунок 4).

2-Анализ соосаждения (pull-down) в системе *in vitro* с рекомбинантными белками мус-*Xanf1* и гибридными с GST LIM-доменами зиксина подтвердили прямое взаимодействие, исключая опосредованность другими клеточными факторами.

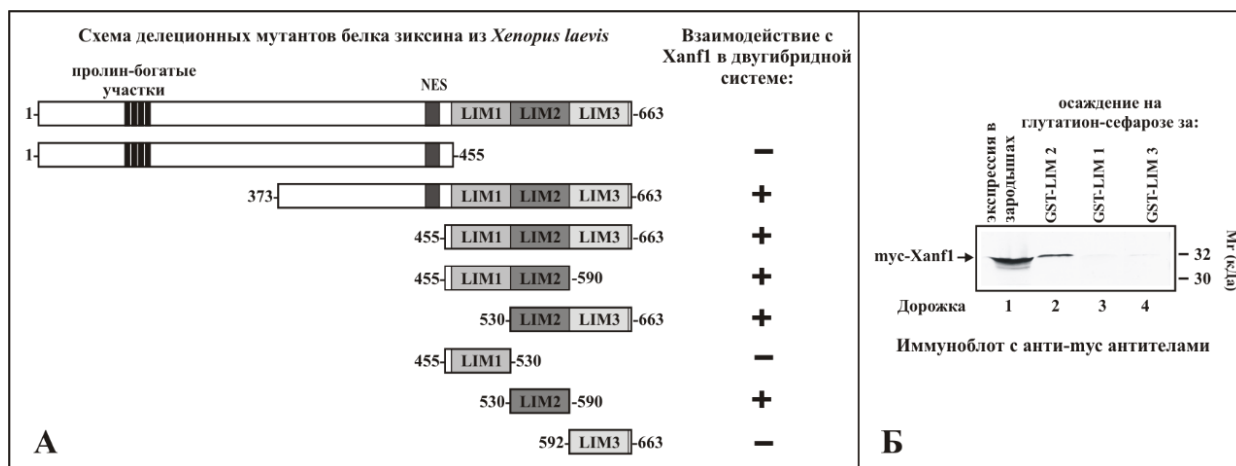


**Рисунок 4.** Исследование взаимодействия зиксина с транскрипционным фактором *Xanf1* в эмбрионах *X. laevis* с использованием коиммунопреципитации. Иммуноблот комплексов, осажденных антителами против мус (дорожки 1, 8) или FLAG (дорожка 3) из лизатов эмбрионов, трансфицированных мРНК *mus-Xanf1* совместно с *FLAG-C'Zyxin* (дорожки 1–4) либо только *mus-Xanf1* (дорожки 8–9). Контроль экспрессии белков проведен по исходным лизатам (дорожки 5–7, 10–11).

## 2.3 Картирование доменов, ответственных за взаимодействие зиксина и *Xanf1*

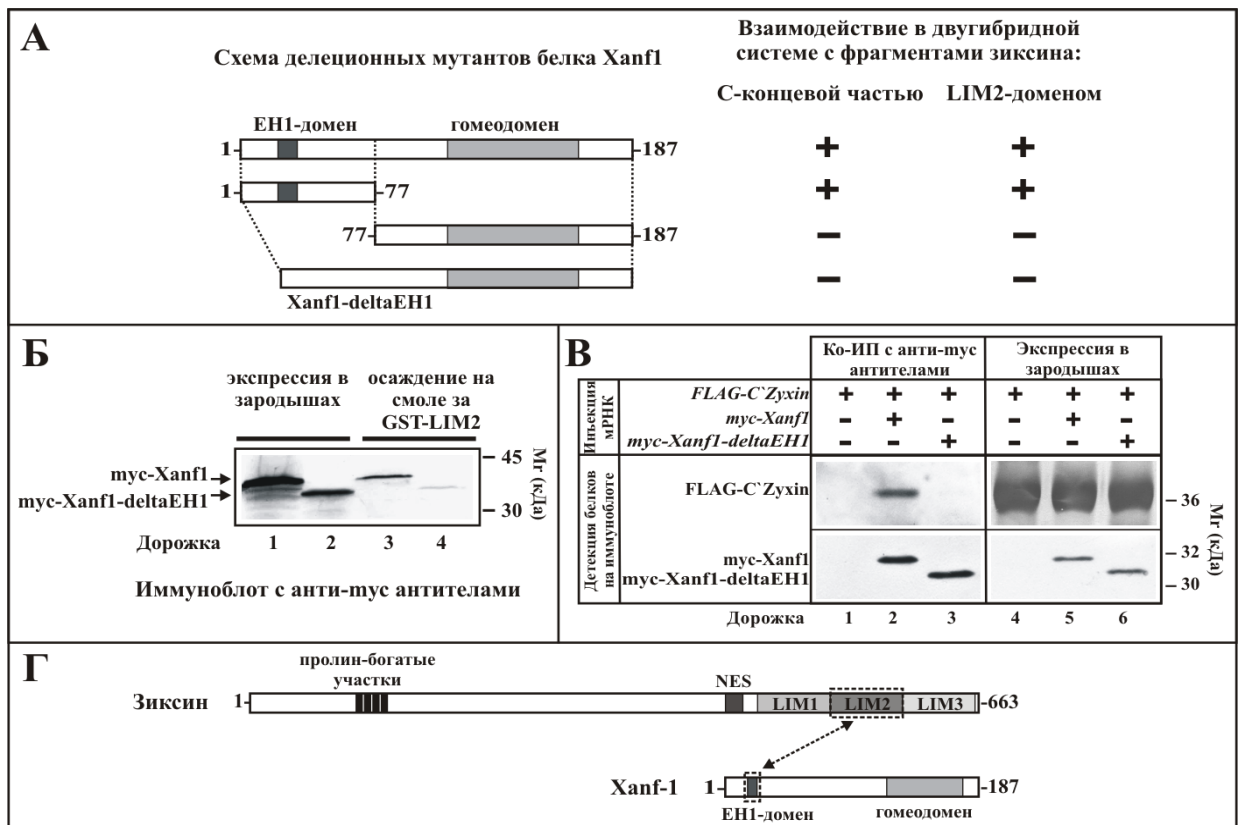
Для определения областей взаимодействия зиксина и *Xanf1* был проведен пошаговый анализ с использованием делеционных мутантов. Сначала с

помощью дрожжевой двугибридной системы был идентифицирован второй LIM-домен (LIM2) зиксина как ключевой для связывания с Ханf1 (Рисунок 5А). Этот результат был подтвержден в системе pull-down с рекомбинантными GST-гибридными белками, где только GST-LIM2 эффективно осаждал Ханf1 (Рисунок 5Б).



**Рисунок 5.** Определение доменов белка зиксина, ответственных за связывание транскрипционного фактора Ханf1. **А.** Анализ взаимодействия делеционных мутантов зиксина с полноразмерным Ханf1 методом yeast two-hybrid в LexA-системе. Схематическая доменная организация мутантов зиксина; символ «+» обозначает способность мутанта активировать экспрессию репортерных генов LEU2 и LacZ в дрожжах. **Б.** Иммуноблот белковых комплексов миц-Ханf1 с GST-гибридами LIM-доменов зиксина после осаждения методом pull-down на глутатион-сефарозе из лизатов зародышей *X. laevis*, инъецированных соответствующей мРНК (дорожки 2–4); дорожка 1 — контроль уровня синтеза миц-Ханf1 в исходных лизатах.

Далее было установлено, что за взаимодействие Ханf1 отвечает его N-концевой репрессорный домен EN1 (Engrailed Homology 1). В дрожжевой системе делеционный мутант Ханf1 $\Delta$ EN1 полностью терял способность связываться как с полным C-концом зиксина, так и с изолированным LIM2-доменом (Рисунок 6А). Специфичность взаимодействия LIM2–EN1 была независимо подтверждена методами pull-down и коиммунопреципитации *in vivo* в эмбрионах *Xenopus* (Рисунок 6Б, В).

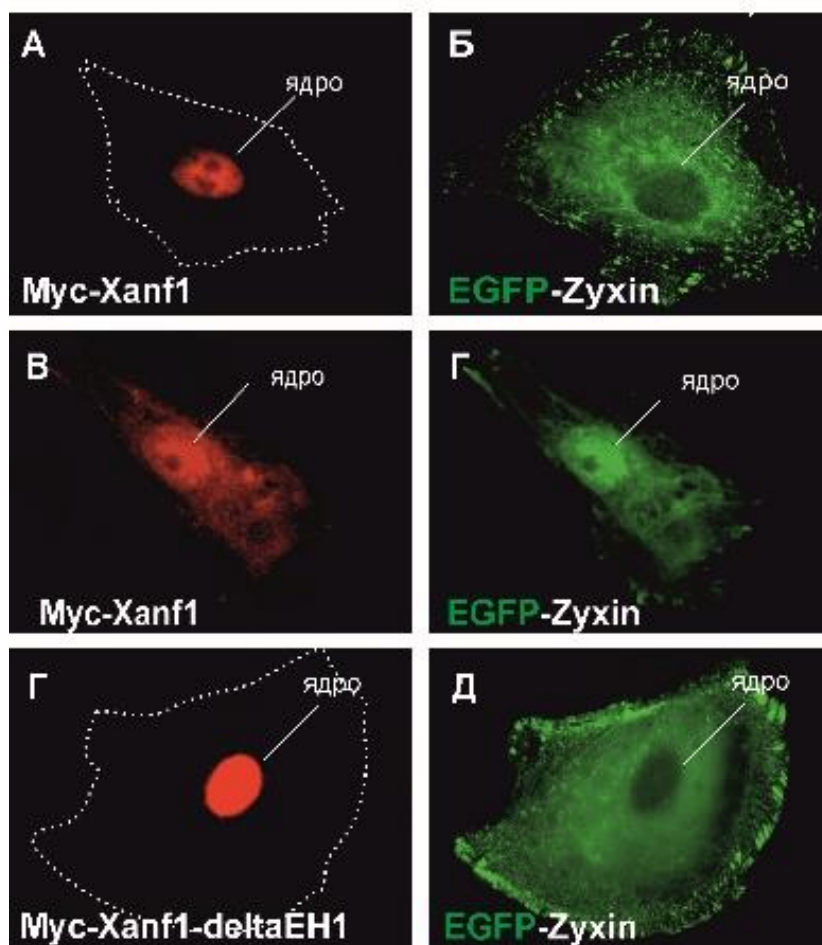


**Рисунок 6.** Идентификация регионов в белке Xanf1, необходимых для связывания с цитоскелетным белком зиксином. **А.** Исследование способности делеционных вариантов белка Xanf1 взаимодействовать с С-концевым фрагментом или вторым LIM-доменом зиксина методом дрожжевой двугибридной системы на основе LexA. Схематично изображена доменная структура протеинов; знак «+» указывает на позитивный результат в тестах на активацию репортерных генов (LEU2 и LacZ) в дрожжевых клетках. **Б.** Анализ соосаждения белков myc-Xanf1 или его делеционного варианта myc-Xanf1-ΔEH1 с гибридным белком GST, слитым со вторым LIM-доменом зиксина методом иммуноблоттинга. Белки осаждали на глутатион-сефарозе из лизатов эмбрионов. Дорожки 1 и 2 демонстрируют уровень экспрессии белков в исходных лизатах. **В.** Анализ белковых комплексов, полученных путем коиммунопреципитации с антителами против myc-эпитопа методом иммуноблоттинга. Исследовали взаимодействие myc-Xanf1 (или его делеционного варианта) с полным С-концевым участком зиксина (FLAG-C'Zyxin) в лизатах эмбрионов, коинъецированных соответствующими синтетическими мРНК. Дорожки 4-6 показывают уровень синтеза белков в исходных лизатах. **Г.** Схематическое представление доменной архитектуры белков зиксина и Xanf1 с выделением участков, опосредующих их связывание.

#### 2.4 Ко-локализация белков Xanf1 и зиксина в клетках линии CV-1

Эксперименты по ко-локализации в клетках линии CV-1 показали, что это взаимодействие изменяет внутриклеточное распределения белков: при совместной экспрессии ядерный Xanf1 обнаруживался в цитоплазме, а цитоплазматический зиксин накапливался в ядре (Рисунок 7). Этот эффект

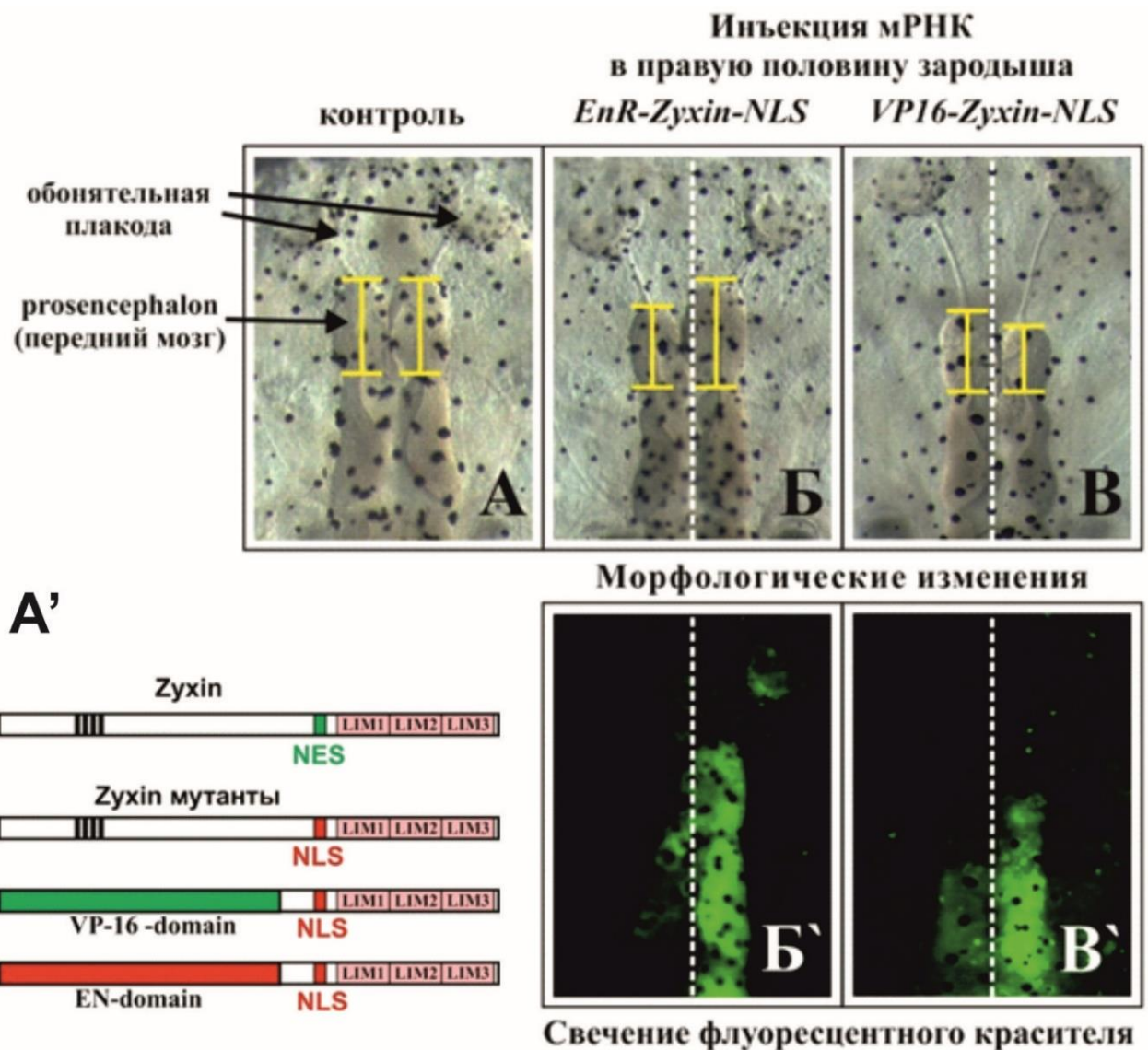
полностью зависел от ЕН1-домена, что подтверждает его участие в связывании с 2 LIM-доменом зиксина.



**Рисунок 7.** Взаимная релокализация зиксина и Xanf1 при коэкспрессии в клетках CV-1. Флуоресцентная микроскопия эпителиальных клеток почки африканской зеленой мартышки, трансфицированных плазмидами: pCS2-мус-Xanf1 (А, ядерная локализация), pCS2-EGFP-Zyxin (Б, цитоплазма с фокальными контактами), и мус-Xanf1 совместно с EGFP-Zyxin (В, Г), мус-Xanf1-deltaEN1 совместно с EGFP-Zyxin (Г внизу, Д). Масштаб 10 мкм.

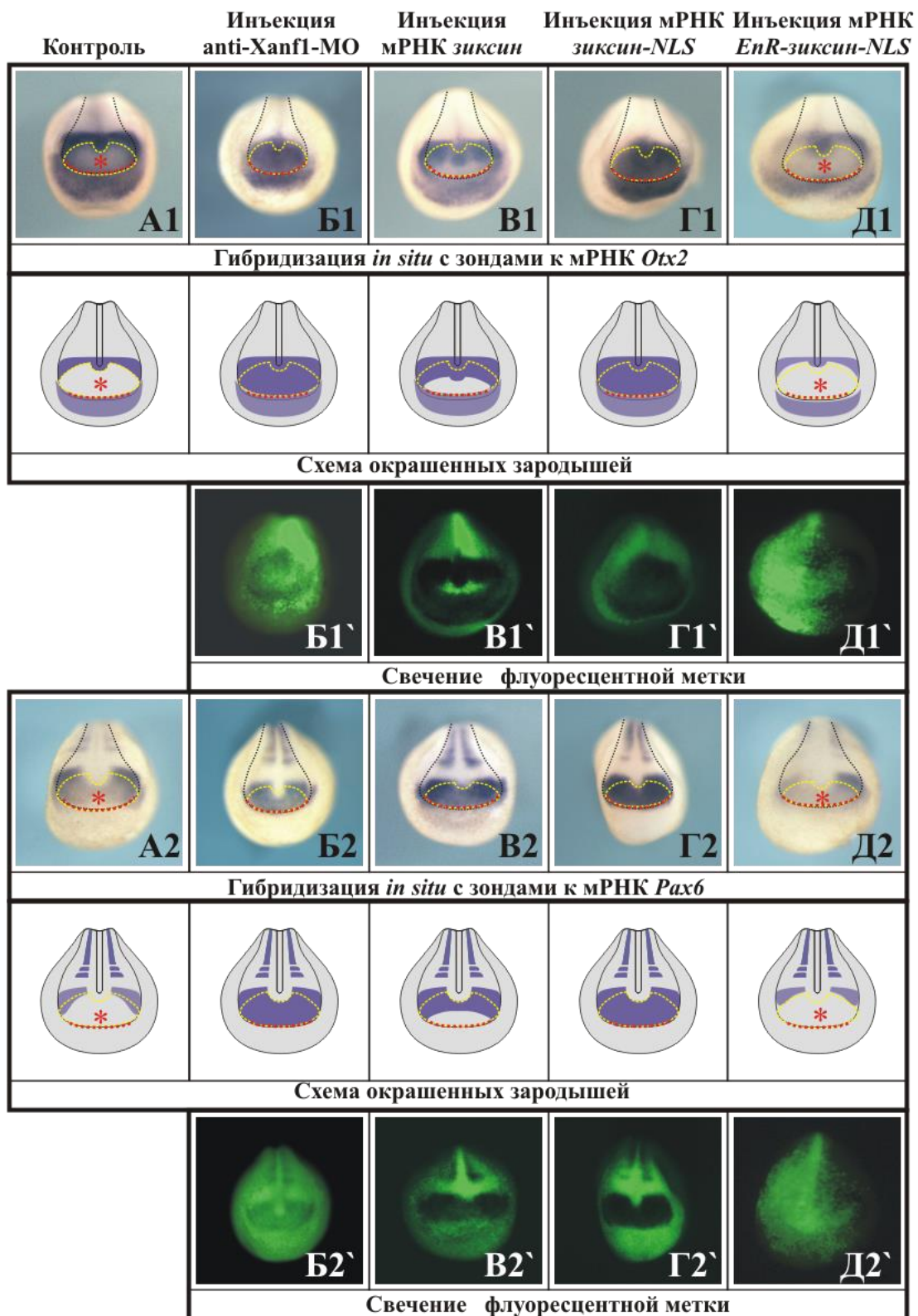
## 2.5 Зиксин подавляет транскрипционную активность репрессора Xanf1

Для доказательства влияния зиксина на формирование переднего отдела мозга были созданы гибридные формы зиксина, слитые с активаторным (VP16) или репрессорным (EnR) доменами. Их оверэкспрессия вызывала противоположные морфогенетические эффекты: активаторная форма имитировала нокдаун Xanf1 (редукция мозга), а репрессорная форма — его сверхэкспрессию (увеличение мозга). Клеточно-автономный характер эффектов подтверждал непосредственное участие зиксина в регуляции (Рис.8).



**Рисунок 8.** Морфологические дефекты переднего мозга у головастика *X. laevis* (ст. 45, дорсальный вид) после микроинъекций доминантно-негативных гибридов зиксина (схемы A'). **A:** Контроль (неинъектированный зародыш). **Б:** *EnR-NLS*-зиксин (репрессорная версия) — гипертрофия переднего мозга в инъектированной половине. **В** *VP16-NLS*-зиксин (активирующая версия) — редукция переднего мозга. **Б', В'** Распределение материала по наличию FLD

Функциональный анализ *in vivo* продемонстрировал, что зиксин выступает негативным регулятором репрессорной активности *Xanf1*. Сверхэкспрессия зиксина (особенно его ядерно-локализованной формы, *Zyxin-NLS*, в которой сигнал ядерного экспорта NES заменен на сигнал ядерной локализации NLS) в эмбрионах *Xenopus* приводила к экспансии областей экспрессии генов-мишеней *Xanf1* (*Otx2*, *Pax6*) (Рисунок 9).



**Рисунок 9.** Сверхэкспрессия зиксина расширяла зоны экспрессии *Otx2* и *Pax6* в передней части нервной пластинки. **A1, A2:** Контроль — экспрессия *Otx2* (A1) и *Pax6* (A2) в неинъектированных зародышах. **B1–B2:** МО-Xanf1 (морфолино-олигонуклеотиды против мРНК *xanf1*). **B1–B2:** мРНК зиксина. **Г1–Г2:** мРНК доминантно-репрессорных форм зиксина с NLS (сигнал ядерного экспорта) и **Д1–Д2:** EnR-зиксин-NLS (LIM-доменная область зиксина, содержащая сигнал ядерного

экспорта NLS, гибридная с EnR-репрессорным доменом). Контроль распределения инъекций — FLD (Б1'–Д1', Б2'–Д2'). Пунктир: черный — границы нервной пластинки; красный — передний край нервной пластинки; желтый — зона экспрессии *Xanf1*. Звездочка на схеме (\*) — «пробел» в зонах экспрессии генов *Otx2/ Pax6*.

Полученные данные доказывают, что зиксин является прямым белковым партнером и физиологически значимым негативным регулятором транскрипционного репрессора *Xanf1*. Механизм регуляции основан на специфичном связывании LIM2-домена зиксина с EN1-доменом *Xanf1*, что может приводить к изменению внутриклеточной локализации *Xanf1* и/или прямому подавлению его репрессорной активности на промоторах генов-мишеней.

### **3 Поиск белковых партнеров зиксина на ранних стадиях развития**

Для поиска белков-партнеров зиксина был использован дрожжевой двугибридный скрининг кДНК-библиотеки эмбрионов *X. laevis* на стадии гастрюлы (12 стадия) в *preu*-векторе PB42AD. В качестве "приманки" был использован С-концевой LIM-доменного фрагмента зиксина (а.о. 455-664) в bait-векторе PMW 103. После проверки на специфичность наиболее интересными с биологической точки зрения оказались белки, связанные с сигнальным путем Hedgehog (Hh). Были идентифицированы трансмембранный рецептор Patched 2 (*Ptc2*) и ключевые транскрипционные эффекторы этого каскада- *Gli1* и *Zic1*. Кроме этого, обнаружен белок *Ybx1* (NSEP1) — РНК-связывающий белок, компонент mRNP-комплексов. Этот результат впервые указал на потенциально новую роль зиксина как возможного регулятора морфогенетического сигналинга, определив направление дальнейшего исследования.

#### **3.1 Определение областей взаимодействия белков зиксин и *Ptc2***

Для выяснения механизма влияния зиксина на инициацию сигнального каскада Hedgehog было изучено его взаимодействие с рецептором *Ptc2*. Методом коиммунопреципитации *in vivo* подтверждено образование комплекса между FLAG-меченым С-концом зиксина и цитоплазматическим доменом *mus-Ptc2* в эмбрионах, а также обнаружен комплекс эндогенного зиксина с *mus-Ptc2* (Рисунок 10, а, б).

С помощью дрожжевого двугибридного анализа и pull-down тестов установлено, что связывание опосредовано вторым LIM-доменом зиксина (а.о. 454–663) и примембранным участком Ptc2 (а.о. 1220–1312) (Рисунок 10, в, г).

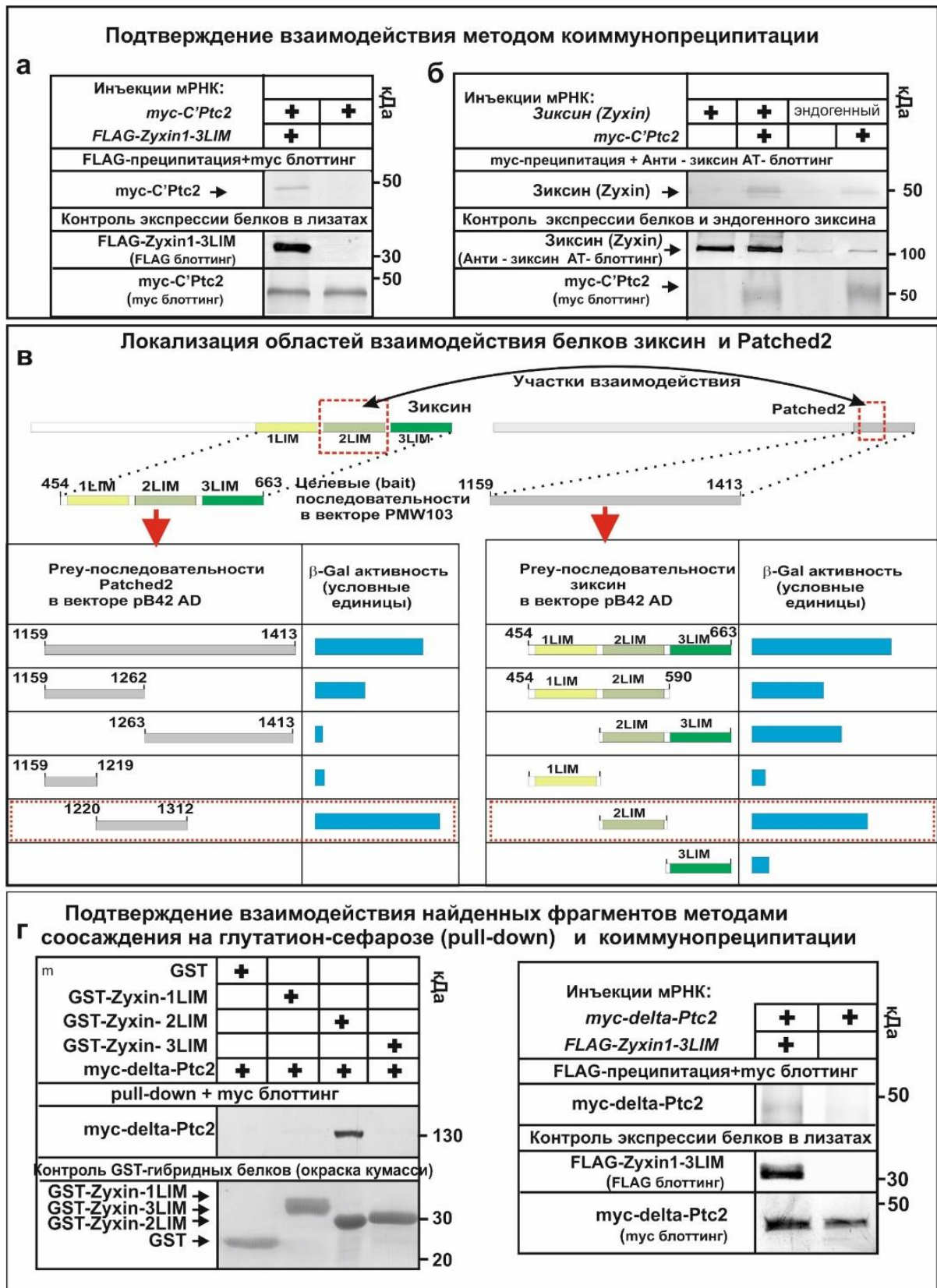


Рисунок 10. Взаимодействие зиксина с Ptc2 опосредовано вторым LIM-доменом

зиксина и примембранным участком Ptc2 (аминокислоты 1220–1312). **А** — подтверждение взаимодействия FLAG-Zyxin-1–3LIM с С-концевым участком Ptc2

**Б** - полноразмерного эндогенного зиксина с С-концевым участком Ptc2 методом коиммунопреципитации из лизатов зародышей.

**В** — локализация областей взаимодействия зиксина и Ptc2 с использованием дрожжевой двугибридной LexA-системы.

**Г** — подтверждение взаимодействия FLAG-Zyxin-1–3LIM и GST-Zyxin-2LIM с участком мус-delta-Ptc2 (1220–1312 а.о.) *in vitro* методом pull-down.

### 3.2 Области экспрессии генов зиксина и Ptc2 перекрываются в ходе эмбриогенеза

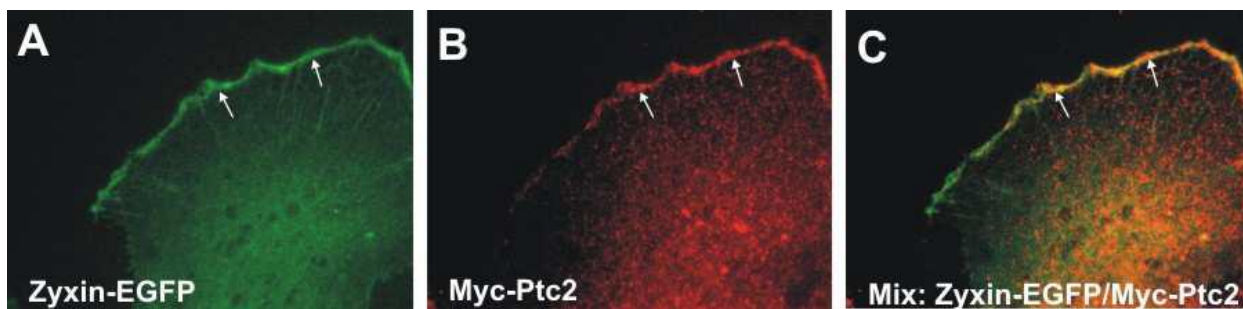
Важным аргументом в пользу биологической значимости выявленного взаимодействия стало совпадение пространственных паттернов экспрессии генов зиксин и ptc2. Гибридизация *in situ* на целых зародышах *X. laevis* на стадии средней нейрулы (ст. 15) показала, что домен экспрессии гена ptc2 в медиодорсальной области нервной пластинки полностью перекрывается с зоной максимальной экспрессии зиксина (Рисунок 11).



**Рисунок 11.** Зоны экспрессии генов зиксин и ptc2 перекрываются по центру нервной пластинки у зародышей на стадии средней нейрулы.

### 3.3 Ко-локализация белков зиксин и Ptc2 в примембранном пространстве в клетках фибробластов *Xenopus laevis*

Для подтверждения взаимодействия *in vivo* была исследована внутриклеточная локализация полноразмерных белков в фибробластах *X. laevis* (Xef). Совместная экспрессия Zyxin-EGFP и Ptc2-мус продемонстрировала их четкую колокализацию в многочисленных точках примембранного пространства, что служит свидетельством их взаимодействия в живой клетке (Рисунок12).



**Рисунок 12.** Колокализация белков Zyxin-EGFP (A) и Ptc2(B) С-наложение, стрелками указаны точки колокализации в примембранном пространстве клеток фибробластов *X. laevis* (Xef).

### 3.4 Второй LIM-домен зиксина человека способен взаимодействовать с С-концевым участком рецептора Ptc1 человека в двугибридной дрожжевой системе

Доказательством фундаментальной роли обнаруженного взаимодействия стал факт его эволюционной консервативности. Биоинформатический анализ выявил высокую гомологию цитоплазматического домена рецептора Ptc2 *X. laevis* и цитоплазматического домена рецептора Ptc1 человека. Экспериментальная проверка в дрожжевой двугибридной системе подтвердила, что LIM-доменная область зиксина человека специфически связывается с цитоплазматическим доменом рецептора Ptc1 человека, причем взаимодействие было проверено переменной векторов в двугибридной системе.



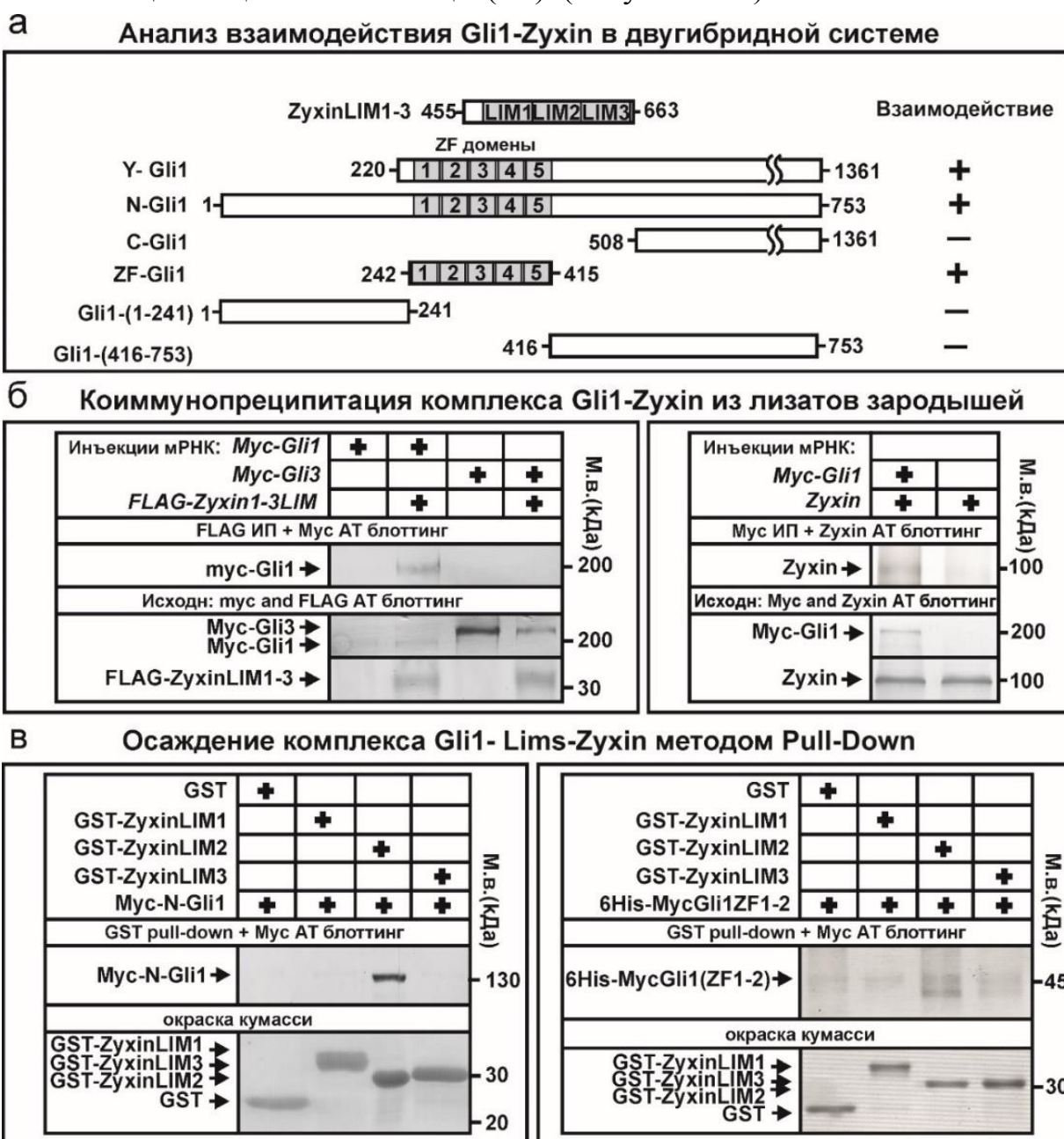
**Рисунок 13.** Области взаимодействия LIM-доменной части зиксина человека (hZyxin) и цитоплазматического участка рецептора hPtc1.

Таким образом, взаимодействие зиксина с рецептором Hedgehog является эволюционно консервативным механизмом, сохранившимся у млекопитающих. Учитывая, что мутации в цитоплазматическом домене рецептора Ptc1 человека ассоциированы с тяжелыми пороками развития и онкогенезом, открытое взаимодействие представляет собой новую

перспективную мишень для исследований в области молекулярной биологии развития и онкологии.

### 3.5 Анализ взаимодействия зиксина с транскрипционным фактором Gli1

Для точного определения областей взаимодействия зиксина с эффектором пути Hedgehog, транскрипционным фактором Gli1, на первом этапе был применен метод дрожжевой двугибридной системы. Анализ серии делеционных конструкций Gli1 показал, что LIM-доменная область зиксина (а.о. 373–664) специфически связывается с фрагментами Gli1, содержащими его N-концевые цинковые пальцы (ZF). (Рисунок 14 а)..



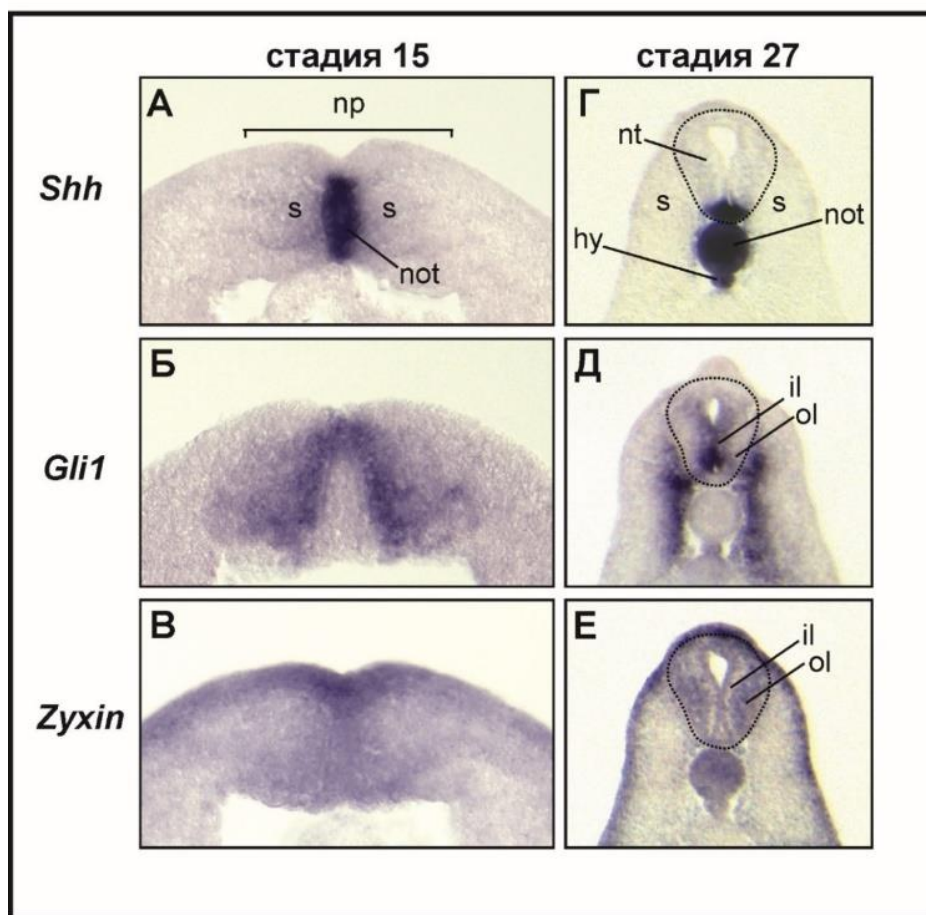
**Рисунок 14.** Анализ взаимодействия между белком зиксин и транскрипционным фактором Gli1. А – Картирование домена связывания в белке Gli1 с помощью

дрожжевой двугибридной системы LexA. Схематически показаны фрагменты Gli1; знаками «+» и «-» отмечены наличие или отсутствие взаимодействия с LIM-доменной областью зиксина.

**Б** – Подтверждение взаимодействия методом ко-иммунопреципитации *in vivo*.

Показана иммунопреципитация полноразмерного или рекомбинантного зиксина из лизатов эмбрионов *X. laevis* с последующей детекцией связанного белка Gli1. **В** – Идентификация доменов, ответственных за связывание, методом соосаждения pull-down *in vitro*. Показано специфическое взаимодействие второго LIM-домена зиксина с фрагментом Gli1, содержащим цинковые пальцы.

Сравнение методом гибридизации *in situ* (WISH) на поперечных срезах эмбрионов 15 и 27 стадий показало динамику зон экспрессии генов *Shh*, *Gli1*, зиксина. На стадии 15 области максимальной экспрессии зиксина и Gli1 в нервной пластинке совпадают, что создает условия для их взаимодействия. К стадии 27 их паттерны становятся комплементарными: зиксин экспрессируется преимущественно в наружном слое и дорсальной части нервной трубки, а Gli1 — во внутреннем слое (Рисунок 15).



**Рисунок 15.** Распределение транскриптов *Shh* (А,Г), *Gli1* (Б,Д) и зиксина (В,Е) с

использованием WISH на поперечных срезах эмбрионов средней нейрулы (стадия 15) и хвостовой почки (стадия 27). Нр-нервная пластинка, not-нотохорда, s-сомиты, nt-нервная трубка с внутренним il и внешним ol слоями.

### 3.6 Внутриклеточная локализация белков зиксина и Gli1 в фибробластах

Другое доказательство функционального взаимодействия зиксина и Gli1 *in vivo* было получено в экспериментах по иммунофлуоресцентному анализу в фибробластах *X. laevis*. Совместная экспрессия белков (EGFP-Zyxin и myc-Gli1) выявила их четкую колокализацию в двух ключевых компартментах: вдоль актиновых стресс-фибрилл в области фокальных адгезий и внутри ядра (Рисунок 16 А-А"). Количественный анализ показал, что это взаимодействие является взаимным: зиксин частично рекрутирует Gli1 из ядра в цитоплазму, в то время как сам Gli1 способствует ядерной аккумуляции зиксина (Рисунок 16, Д-З).

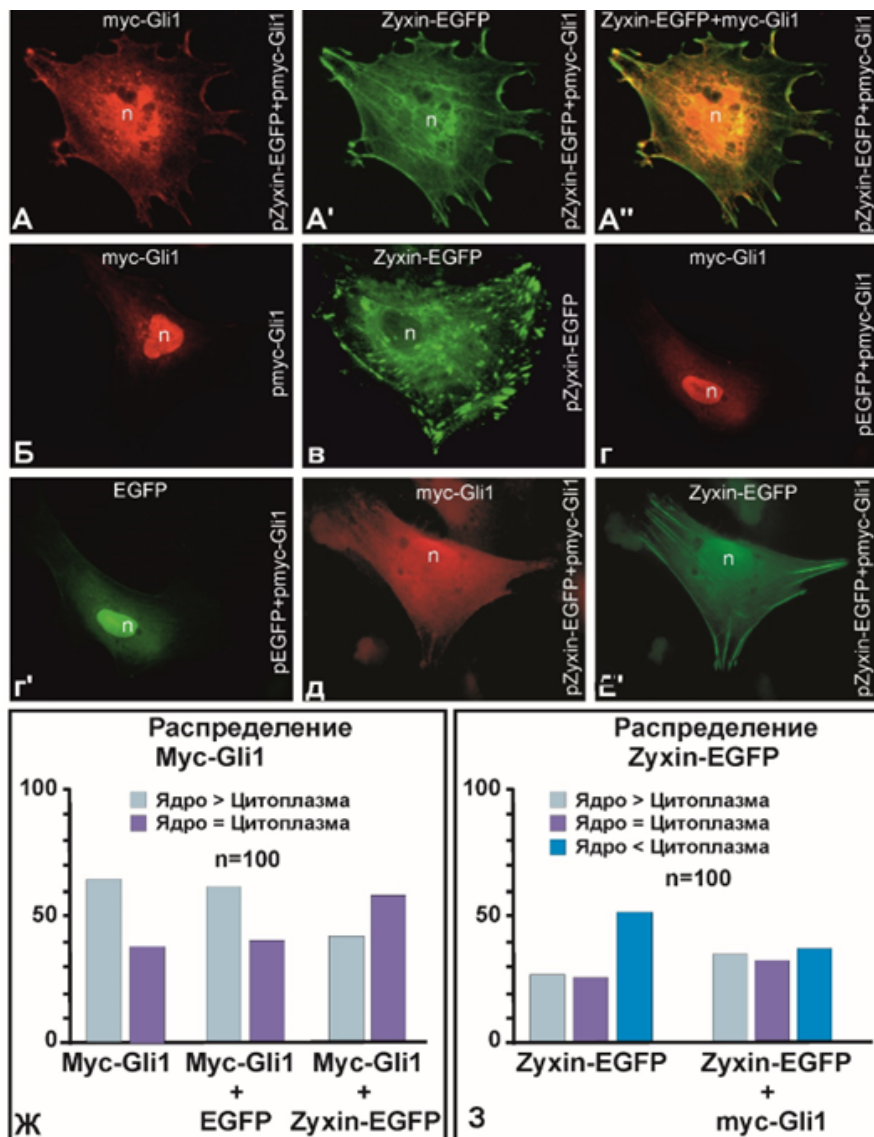


Рисунок 16. Колокализация белков Gli1 и зиксина и их взаимное влияние на

внутриклеточное распределение в фибробластах *X. laevis*. (А–Г) Иммунофлуоресцентный анализ локализации белков. Зеленый цвет: EGFP или EGFP-Zuxin. Красный цвет: белок мус-Gli1, детектированный с помощью анти-мус антител, конъюгированных с флуорохромом Texas Red. Желтый цвет на совмещенных изображениях указывает на области колокализации. (А–А'') Совместная экспрессия EGFP-Zuxin и мус-Gli1. Наблюдается колокализация белков вдоль стрессовых волокон и в ядре (n). (В) Контроль: локализация EGFP-Zuxin при одиночной экспрессии. (Б) Контроль: локализация мус-Gli1 при одиночной экспрессии. (Г,Г') Контроль: совместная экспрессия мус-Gli1 и свободного EGFP. (Д–Е') Примеры клеток, использованных для анализа соотношения флуоресценции в ядре и цитоплазме (NCR). (Ж) Ядерно-цитоплазматическое соотношение (NCR, Nuclear-to-Cytoplasmic Ratio) интенсивности флуоресценции для белков мус-Gli1 (Ж) и EGFP-Zuxin (З) в различных условиях трансфекции. Проанализировано по 200 клеток каждого типа в двух независимых экспериментах. На диаграммах показан процент клеток с разным типом распределения белка: преимущественно ядерное (N>C), равномерное (N=C) и преимущественно цитоплазматическое (N<C).

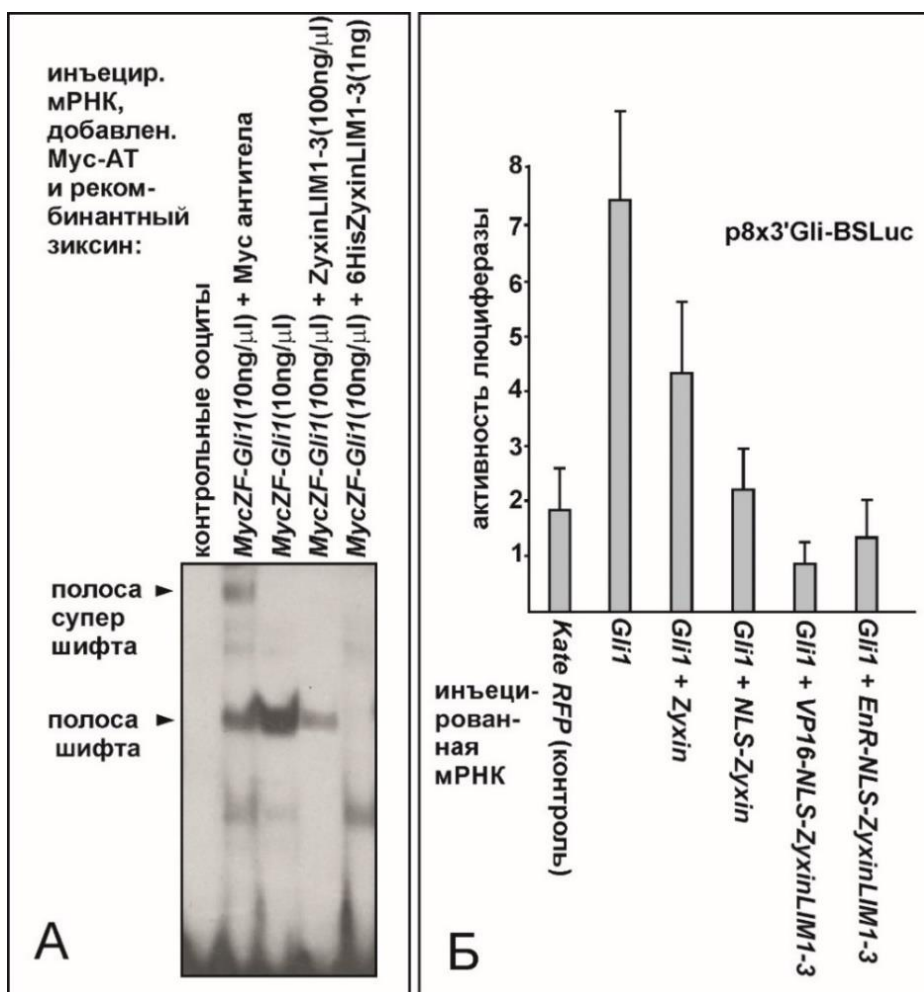
### **3.7 Функциональный анализ влияния зиксина на активность Hedgehog-сигнального пути**

Для оценки функционального значения взаимодействия зиксина с Gli1 был применен люциферазный репортерный тест, основанный на использовании вектора р8х3'Gli-BSLuc с геном люциферазы под контролем промотора, содержащего 8 сайтов связывания Gli1.

Было показано, что зиксин значимо подавляет способность Gli1 активировать транскрипцию. Чтобы выяснить механизм этого подавления (блокировка связывания Gli1 с ДНК или ингибирование активационной функции), был проведен EMSA-анализ (Electrophoretic Mobility Shift Assay). Он продемонстрировал, что при коэкспрессии с зиксином образование комплекса Gli1 с ДНК-мишенью значительно снижается.

Этот результат указывает, что зиксин, а именно его LIM-доменная область, напрямую препятствует связыванию Gli1 с целевой ДНК-последовательностью. (Рисунок 17А). Для подтверждения этого механизма действия был проведен люциферазный репортерный тест с химерными белками. Гибриды, состоящие из ядерно-локализованного LIM-домена зиксина (NLS-Zuxin LIM 1-3) и сильных активаторного (VP16) или репрессорного (EnR) доменов, не изменили направление регуляции Gli1, а лишь подавляли активность репортера (Рисунок 17Б). Это доказывает, что связывание с зиксином физически блокирует доступ Gli1 к промотору.

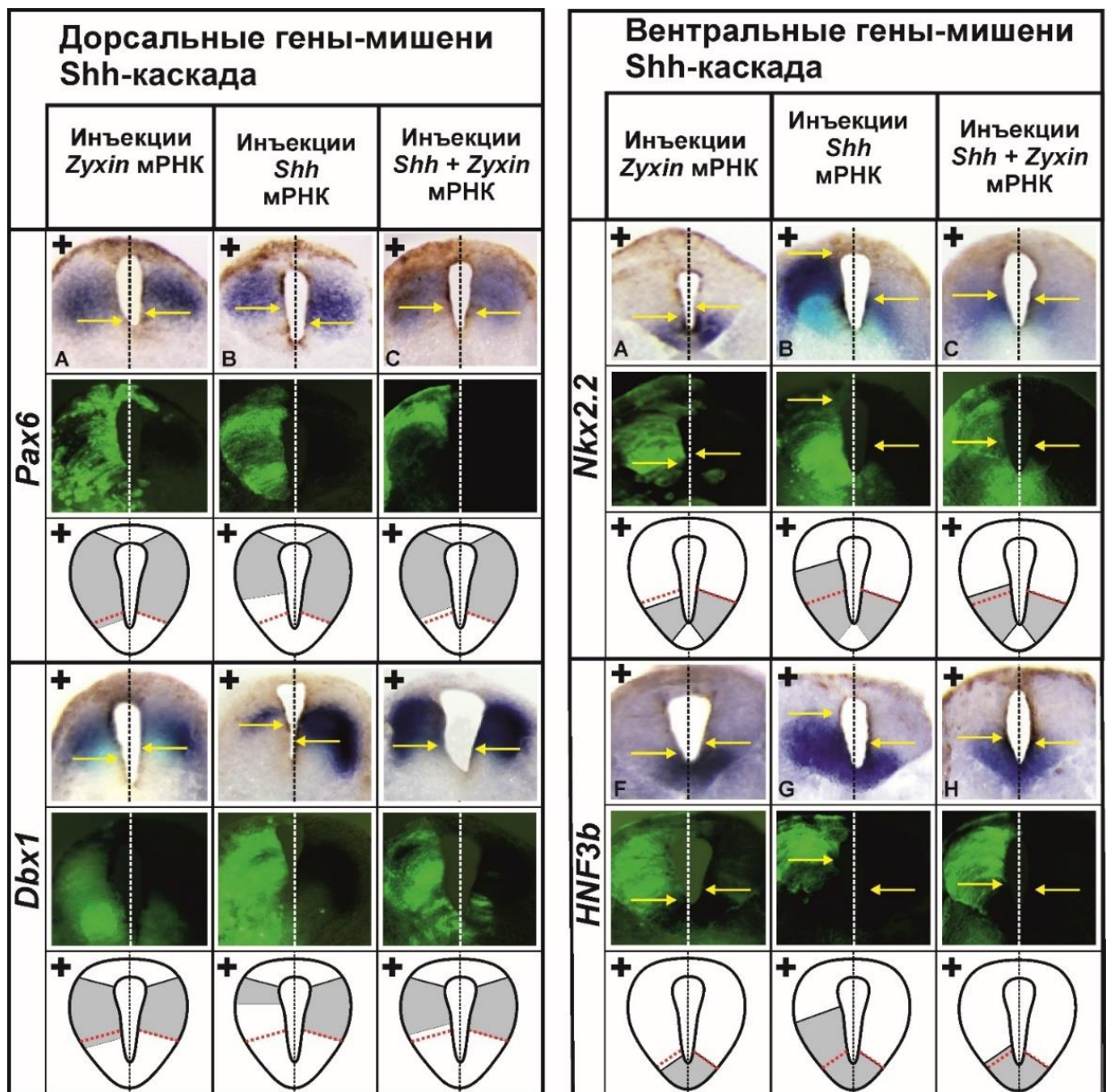
Таким образом, зиксин является негативным регулятором пути Hedgehog, ингибируя связывание Gli1 с ДНК.



**Рисунок 17.** Зиксин препятствует связыванию Gli1 с его целевым промотором. **А.** EMSA демонстрирует снижение связывания Gli1 с целевыми участком ДНК в присутствии зиксина. 1 дорожка - контроль, 2 дорожка - супершифт мус-ZF Gli1 при добавлении мус-антител, 3 дорожка-шифт с мус-ZF Gli, 4 дорожка- ослабление шифта при добавлении LIM-доменной области зиксина, 5 дорожка- ослабление шифта при добавлении LIM-доменной области зиксина, экспрессированного в *E.coli*. **Б.** Анализ эффектов зиксина на активность Gli1, использованием люциферазного репортера: Репортер p8x3'Gli-BSLuc инъецировали в эмбрионы на стадии 2–4 бластомеров в смеси с 1- мРНК *Kate*(контроль), 2- мРНК *Gli1*, 3- РНК зиксин, 4- РНК *NLS*-Зиксин, 5- РНК *EnR*- *NLS* -зиксин, 6- РНК *VP16*- *NLS*-зиксин.

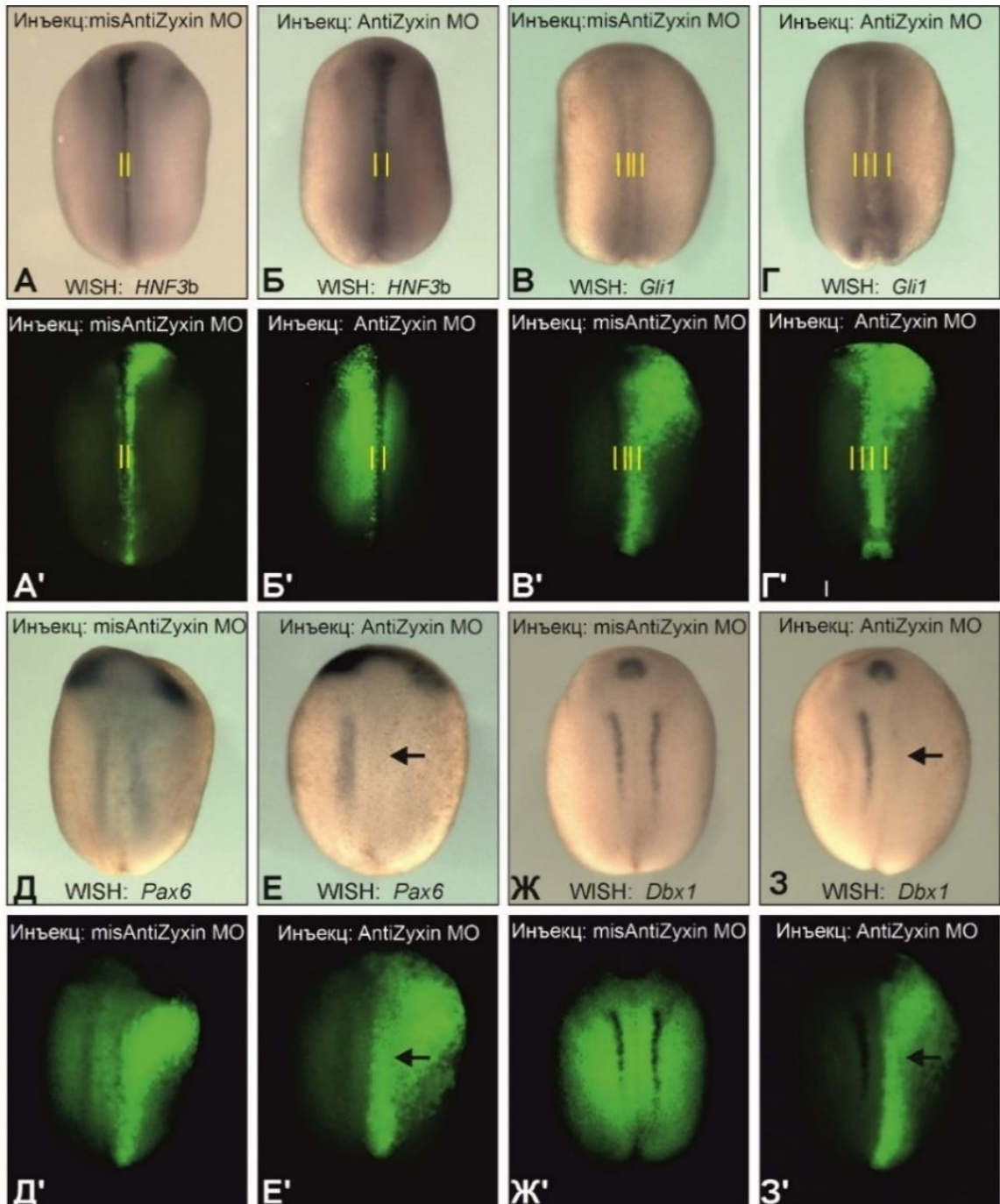
Для оценки биологического значения взаимодействия зиксина с белками Hedgehog-сигналинга методом WISH анализировали экспрессию генов-мишеней этого каскада в нервной трубке эмбрионов *X. laevis* при изменении уровня зиксина. Оверэкспрессия зиксина приводила к вентральному расширению доменов генов класса I (*Pax6*, *Dbx1*), репрессируемых Shh, и дорсальному сужению доменов генов класса II (*Nkx2.2*, *HNF3β*), активируемых Shh. Более того, коинъекция зиксина полностью устраняла аномалии

паттернов *Pax6* и *Dbx1*, вызванные сверхэкспрессией *Shh* (Рисунок 19). Эти данные прямо подтверждают, что зиксин является ингибитором Hedgehog-сигналинга *in vivo*.



**Рисунок 19. Влияние сверхэкспрессии зиксина на гены-мишени Shh-каскада.** Эмбрионы были инъекцированы в правый дорсальный бластомер следующими РНК: **А**- зиксин — 150 пг/эмбрион; **В**-*Shh* — 15 пг/эмбрион; и **С**-смесь этих РНК в указанных концентрациях вместе с флуоресцентным трейсером FLD. После WISH гибридизации эмбрионов на стадии 25 с зондами к генам *Pax6*, *Dbx1*, *Nkx2.2* и *HNF3b* были получены срезы нервной трубки и для каждого гена проведено сравнение на левой (контрольной) и правой (инъекцированной) сторонах нервной трубки. Желтые стрелки на фотографиях указывают границы доменов экспрессии на инъекцированной и неинъекцированной сторонах эмбрионов. Красные пунктирные линии на схематическом изображении сечения нервной трубки указывают нормальные положения границ экспрессии.

Для независимой проверки эффектов зиксина его функцию подавляли с помощью инъекции антисмыслового МО. В этих условиях наблюдались эффекты, противоположные оверэкспрессии: в области действия МО происходило ослабление экспрессии генов класса I (*Pax6*, *Dbx1*) и расширение зон экспрессии генов класса II (*HNF3 $\beta$* , *Gli1*) (Рисунок20). Таким образом, зиксин действует как негативный регулятор Hedgehog-сигналинга *in vivo*, что согласуется с молекулярным механизмом блокировки им ДНК-связывающей способности Gli1.



**Рисунок 20.** Экспрессия генетических мишеней Shh в нервной пластинке эмбрионов, в правую часть которых были введены анти-зиксиновые МО. А-Г Слабое

расширение экспрессии HNF3b, Gli1 (активируемое высоким уровнем сигнала Shh) в областях с клетками, содержащими анти-зиксин MO (см. А'-Г', локализация материала по FLD). Д-З ингибирование экспрессии Pax6, Dbx1 (обычно ингибируется сигнализацией Shh) в областях с клетками, содержащими анти-зиксин MO (см. Д'-З' локализация материала по FLD). Контрольным эмбрионам был введен mis анти-зиксин MO. Все эмбрионы показаны с дорсальной стороны. Стрелки указывают на участки ингибирования экспрессии. Желтые полосы указывают границы доменов экспрессии.

### **3.8 Взаимодействие зиксина с фактором Zic1 и образование тройного комплекса Zic1-Gli1-зиксин**

Дрожжевой двухгибридный скрининг выявил взаимодействие зиксина с С-концевым доменом транскрипционного фактора Zic1 — ключевого регулятора пути Shh. Учитывая прямое взаимодействие Zic1 и Gli1, была выдвинута гипотеза о том, что зиксин может стабилизировать их комплекс.

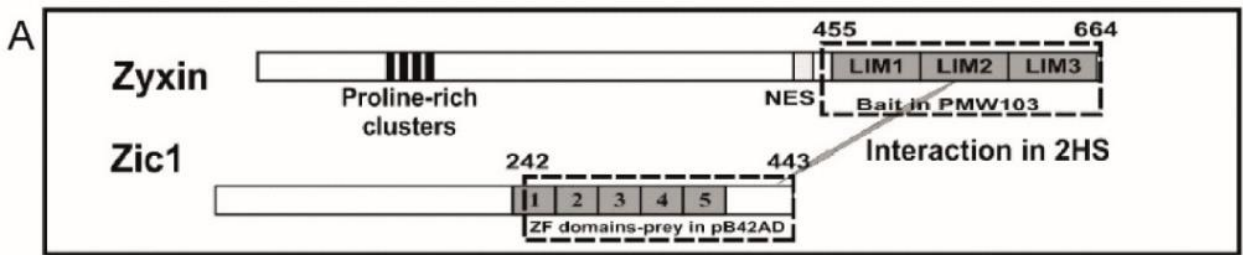
Прямое связывание зиксина с С-концом Zic1 было подтверждено в экспериментах на эмбрионах *X. laevis* методом ко-иммунопреципитации, что согласуется с данными дрожжевого анализа и pull-down тестов. Наиболее сильное взаимодействие опосредовано 2LIM доменом зиксина (Рисунок 21).

Поскольку и Zic1, и Gli1 взаимодействуют со сходными цинк-пальцевыми доменами, была проверена гипотеза об образовании тройного комплекса. Эксперимент по ко-иммунопреципитации подтвердил образование тройного комплекса Zic1-Gli1-зиксин в эмбрионах (Рисунок 22 А). Показано, что Zic1 способствует ядерной транслокации как Gli1, так и зиксина (Рисунок 22 б, в). Функциональный анализ выявил, что комплекс Zic1+Gli1 обладает повышенной транскрипционной активностью, причем зиксин дополнительно усиливает этот эффект, несмотря на его ранее показанную способность ингибировать Gli1 (Рисунок 22 г).

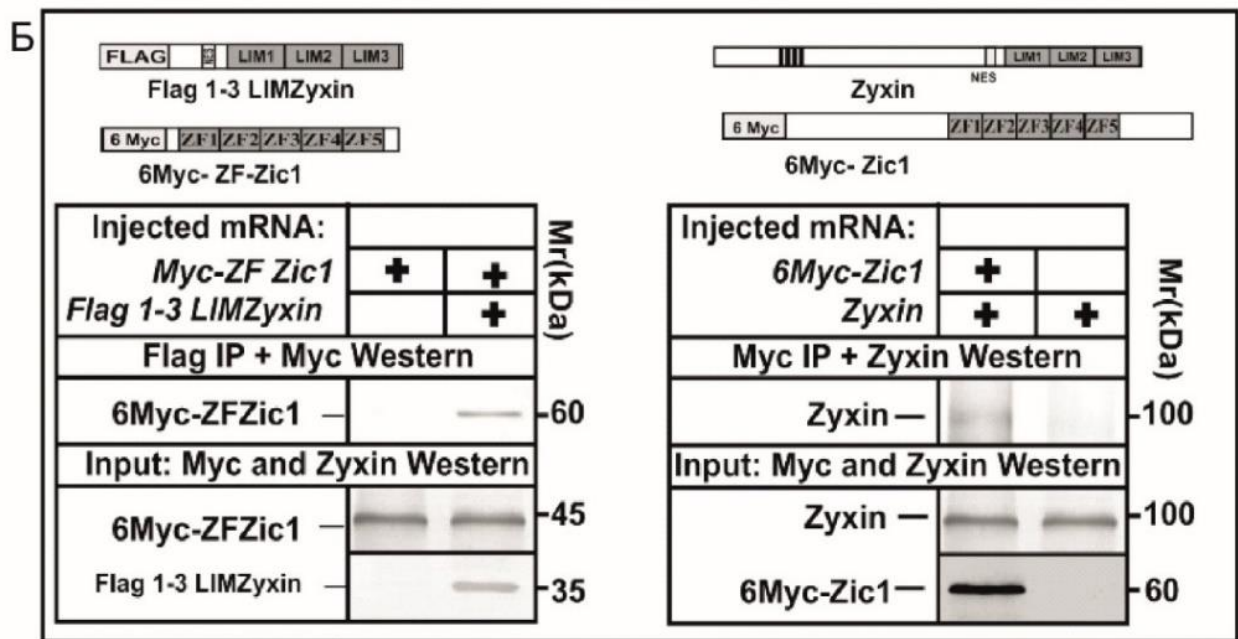
Эти данные раскрывают новую роль зиксина как контекст-зависимого модулятора пути Hedgehog: в отсутствие Zic1 он ингибирует Gli1, удерживая его в цитоплазме; в присутствии Zic1 зиксин интегрируется в ядерный комплекс, где может способствовать его стабилизации или тонкой регуляции. Этот дуализм может лежать в основе пространственно-специфичной регуляции Shh-сигналинга в разных областях нервной пластинки, а также

представлять собой молекулярную мишень для модуляции этого критического пути развития.

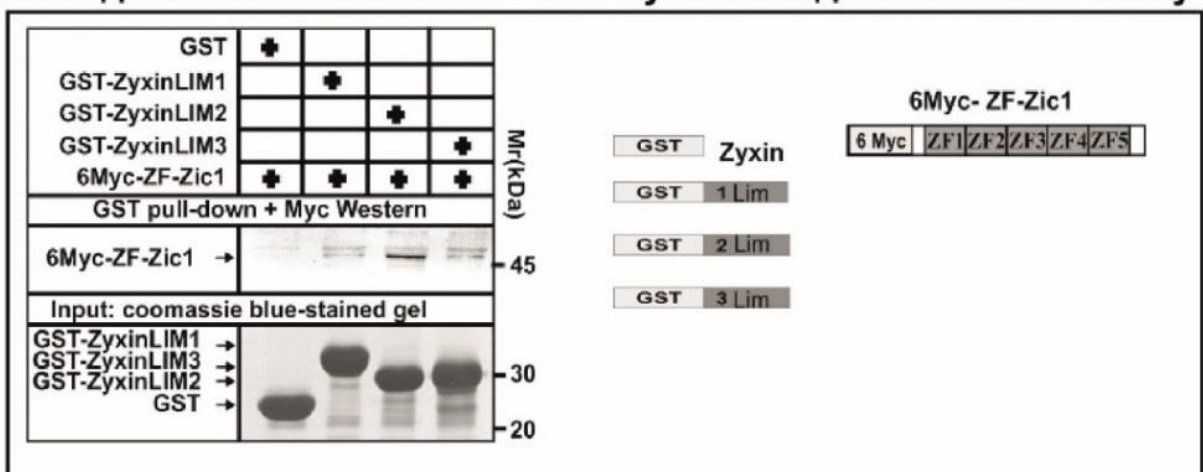
### Анализ взаимодействия Zic1-Zyxin в двугибридной системе



### Коиммунопреципитация комплекса Zic1-Zyxin из лизатов зародышей

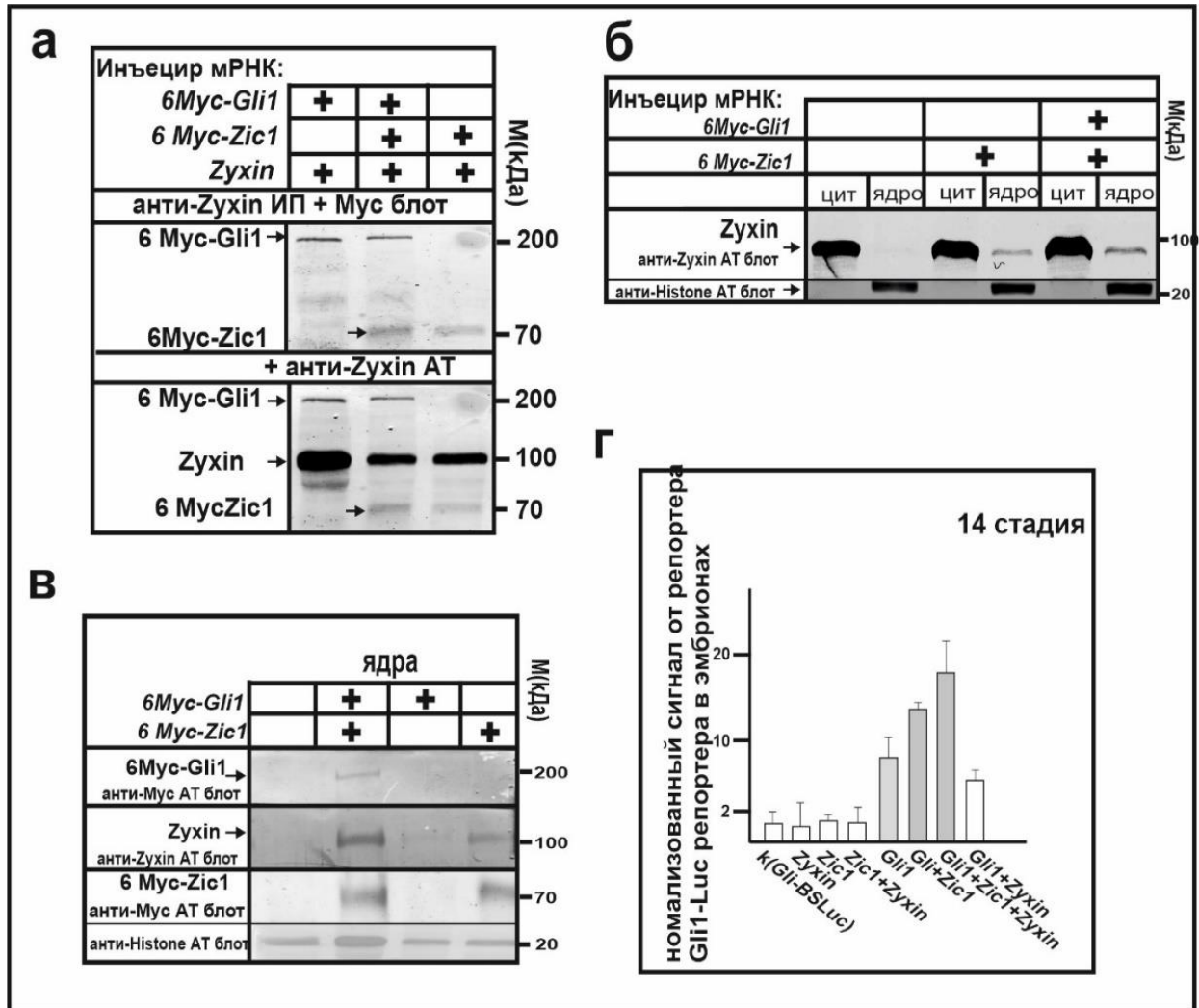


### В Осаждение комплекса Zic1- Lims-Zyxin методом Pull-Down assay



**Рисунок 21.** Zic1 и зиксин связываются друг с другом напрямую. А-принципиальная схема белков зиксин и Zic1 и их фрагментов (области, отмеченные пунктирной рамкой). Б, сверху - схема белков, используемых для коиммунопреципитации: LIM-доменная область зиксина, содержащая фрагмент FLAG-1-3LIM Zyxin, область Zic1, содержащая цинковые пальцы (zinc-fingers, 6myc-ZF-Zic1) и полноразмерные белки

зиксин и 6мус-Zic1. Анализ FLAG-IP для связывания 6Мус-ZF Zic1 с Flag 1-3 LIM Zyxin (слева) и анализ мус-IP для связывания полноразмерного зиксина с полноразмерным 6мус-Zic1 (справа) из экстрактов эмбрионов *Xenopus*, которым были введены соответствующие мРНК. В- Анализ pull-down для 6мус-ZF Zic1 и GST- LIM доменов зиксина (гибридные белки с GST были получены в *E. coli*). Справа - принципиальная схема этих фрагментов белка.

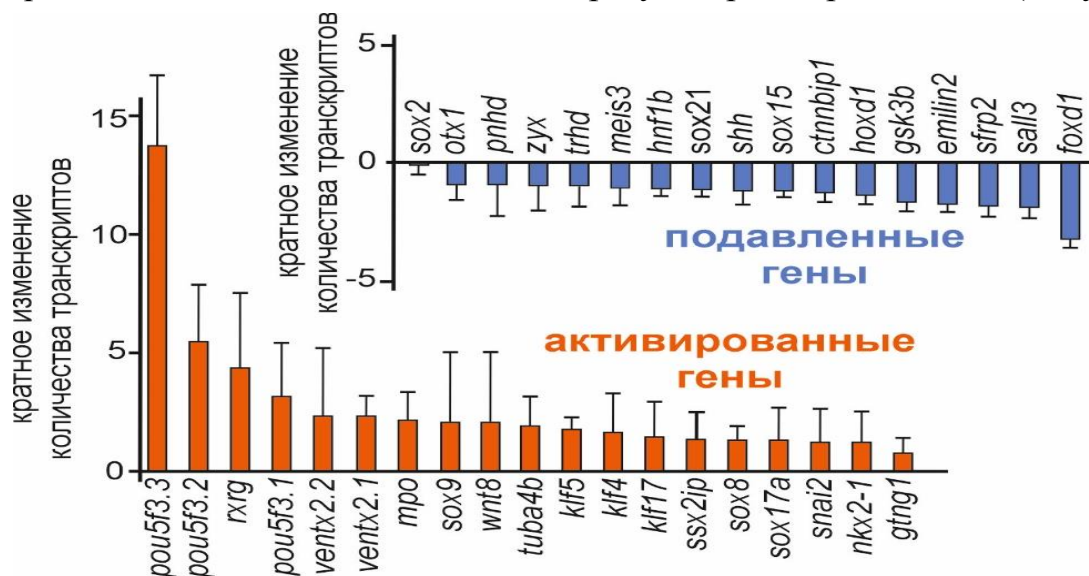


**Рисунок 22.** Формирование тройного комплекса Zic1, Gli1 и зиксина в ядре и его влияние на функциональную активность. А. Коиммунопреципитация с антителами против зиксина, демонстрирующая осаждение тройного комплекса, содержащего 6мус-Zic1 и 6мус-Gli1, из лизатов эмбрионов *X. laevis*, инъектированных соответствующими мРНК. Б. Влияние коэкспрессии 6мус-Zic1 и 6мус-Gli1 на субклеточную локализацию зиксина в эмбрионах *Xenopus*. Показано распределение белка между ядерной и цитоплазматической фракциями. В. Сравнение локализации зиксина и Gli1 в ядрах, после фракционирования на цитоплазматическую и ядерную фракции клеток эмбрионов. Г. Анализ активности люциферазного репортера 8Gli-BSLuc при коэкспрессии

Zic1, Gli1 и зиксина по отдельности и в различных комбинациях (Gli1+Zic1, Gli1+Zic1+Zyxin, Zic1+Zyxin, Gli1+Zyxin).

#### 4. Широкомасштабный транскриптомный анализ подтверждает роль зиксина как ключевого интегратора дорсо-вентральных программ развития

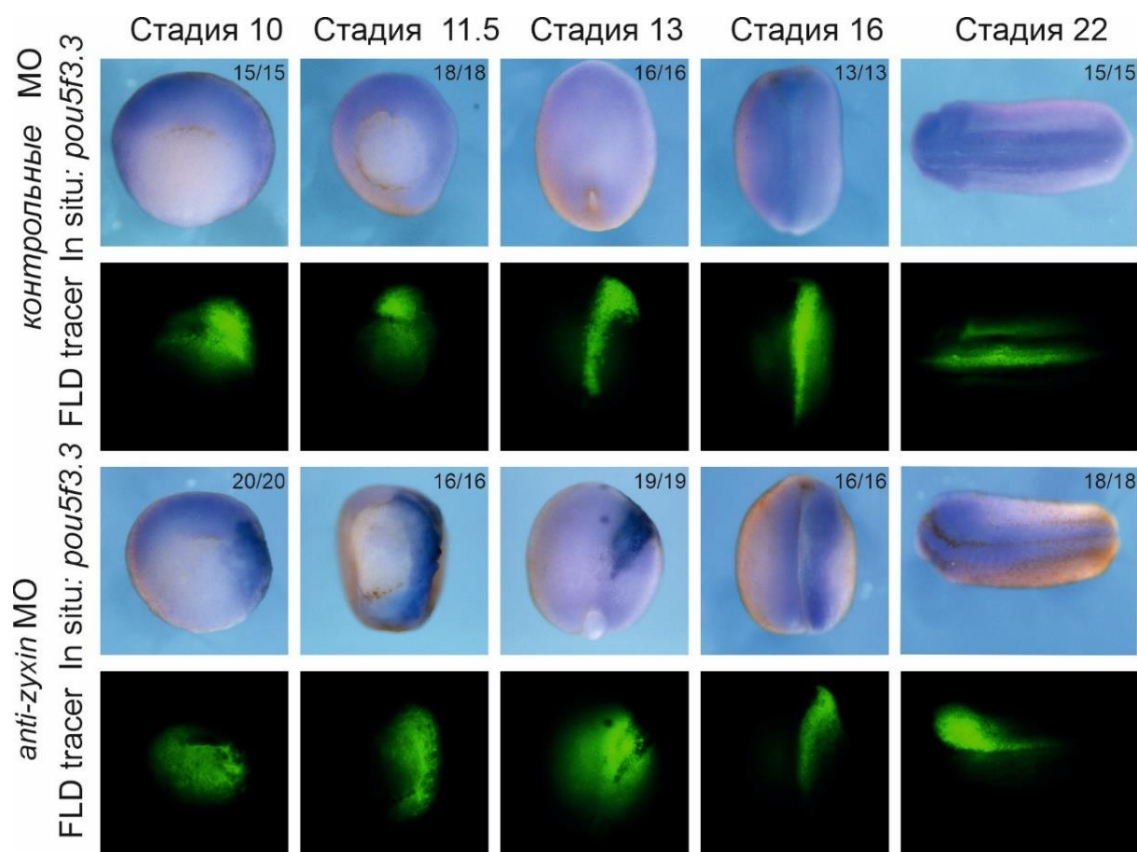
Сравнительный транскриптомный анализ клеток нервной пластинки эмбрионов *X. laevis* при подавлении и оверэкспрессии зиксина выявил выраженную асимметрию. Дефицит белка привел к изменению экспрессии 2485 генов, тогда как его избыток повлиял лишь на 11, что указывает на критическую роль базального уровня зиксина. GO- и KEGG-анализ показал, что нокадаун вызывает подавление генетических программ дорсальных структур (нервная пластинка, гребень, хорда) и одновременную активацию программ вентральных и эпидермальных производных. Это свидетельствует, что зиксин необходим для поддержания баланса между нейральной и не-нейральной судьбой клеток. Результаты секвенирования были подтверждены qRT-PCR для 36 ключевых регуляторов развития (Рисунок 23).



**Рисунок 23.** Подтверждение данных NGS для ключевых генов методом количественной ОТ-ПЦР (qRT-PCR).

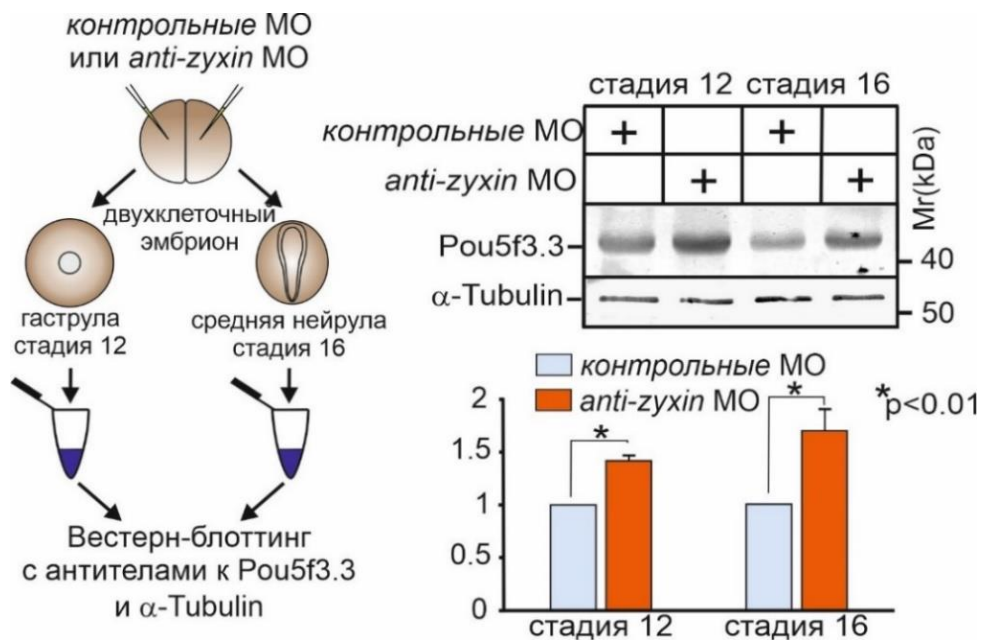
Транскриптомный анализ показал, что нокадаун зиксина активирует гены семейства *POU5F3* – ортологи фактора плюрипотентности OCT4, наиболее сильно активировался материнский ген *rou5f3.3* (Рисунок 23). Эксперимент по восстановлению функции (rescue assay) подтвердил, что нормализовать уровень *rou5f3.3* способны полноразмерный зиксин и его С-концевой LIM-

домен, но не N-концевая область. Это указывает, что за репрессию гена ответственна LIM-доменная область зиксина, опосредующая его белковые взаимодействия. Гибридизация *in situ* (WISH) также продемонстрировала локальное повышение уровня мРНК *pou5f3.3* именно в областях действия антисмыслового морфолино к РНК зиксина (Рисунок 24).



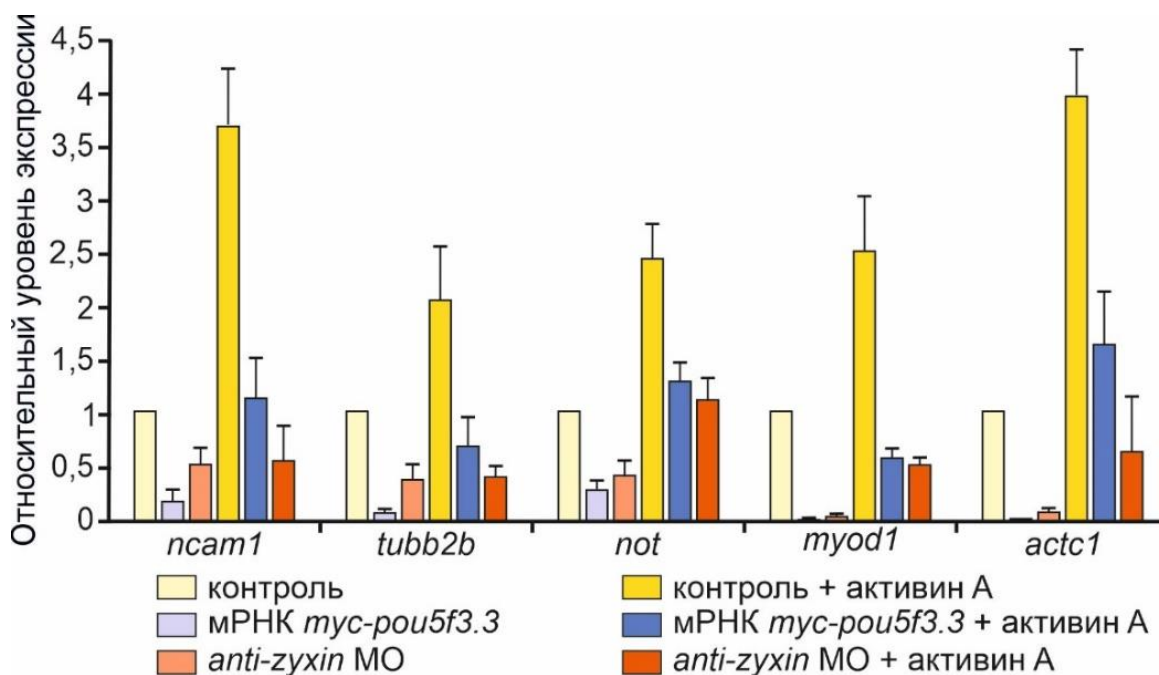
**Рисунок 24.** Локальное усиление экспрессии *pou5f3.3* в ответ на нокдаун зиксина, выявленное методом WISH. Показаны результаты гибридизации на цельных зародышах *X. laevis* с антисмысловым зондом к мРНК *pou5f3.3*. Микроинъекцию морфолино к зиксину (anti-zuxin MO), и флуоресцентного декстрана (FLD) выполняли в один бластомер на 2-клеточной стадии, что привело к подавлению зиксина в правой половине зародыша. Наблюдается устойчивое усиление сигнала мРНК *pou5f3.3* в правой (инъекцированной) половине эмбриона по сравнению с левой (контрольной) половиной. Этот эффект впервые регистрируется на стадии гастрюлы (стадия 11) и усиливается в течение нейруляции. В правом верхнем углу указана доля эмбрионов, демонстрирующая представленный паттерн экспрессии, от общего числа проанализированных.

Изменение уровня мРНК *pou5f3.3* привело к статистически значимому накоплению эндогенного белка Pou5F3.3 в эмбрионах с нокдауном зиксина, показанное вестерн-блоттингом с использованием специфичных антител (Рисунок 25).



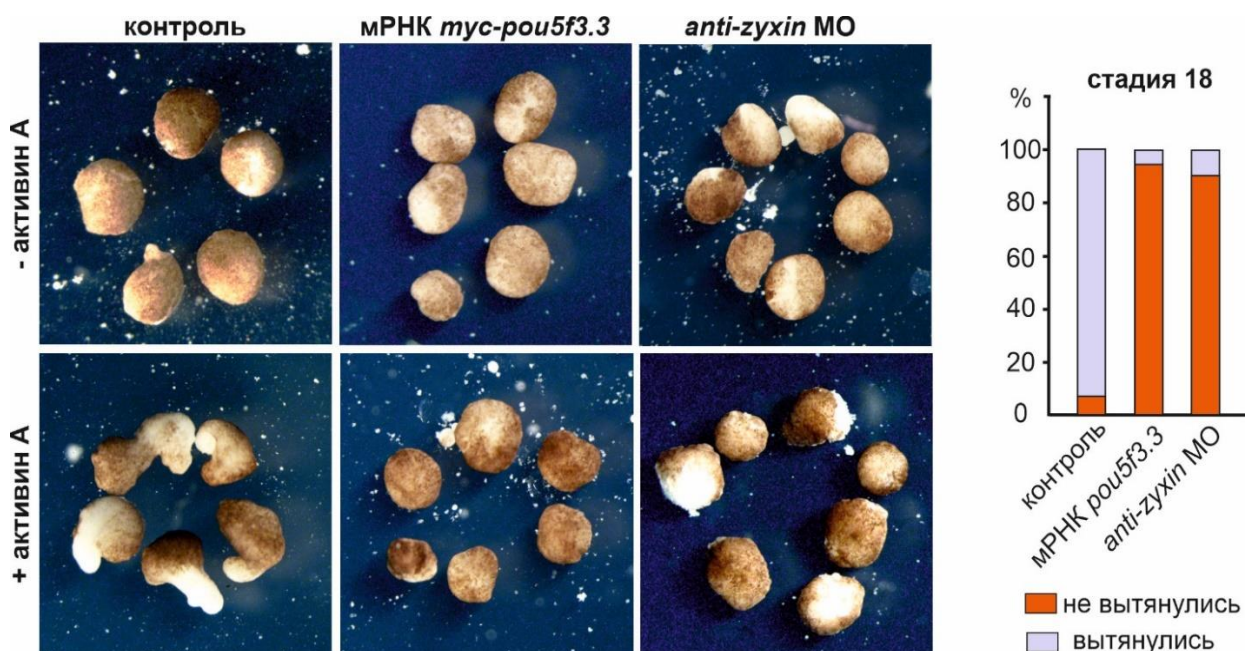
**Рисунок 25.** Подавление зиксина приводит к увеличению количества эндогенного белка Pou5f3.3. Слева: схема эксперимента. Справа: вестерн-блоттинг с антителами к Pou5f3.3. Ниже справа: статистический анализ данных. \*  $p < 0,01$  по критерию Стьюдента

Физиологическая роль этой регуляции была подтверждена в функциональном тесте на эксплантатах анимальных шапочек. Нокдаун зиксина, как и оверэкспрессия Pou5f3.3, блокировал способность клеток к активин-А-индуцированной мезодермальной дифференцировке, что проявлялось в подавлении маркеров дифференцировки (Рисунок 26) и отсутствии вытягивания эксплантатов (Рисунок 27).



**Рисунок 26.** Согласно результатам qRT-PCR, анти-зиксиновые МО блокируют дифференцировку тканей, индуцированную активин-А, аналогично мРНК *mus-pou5f3.3*

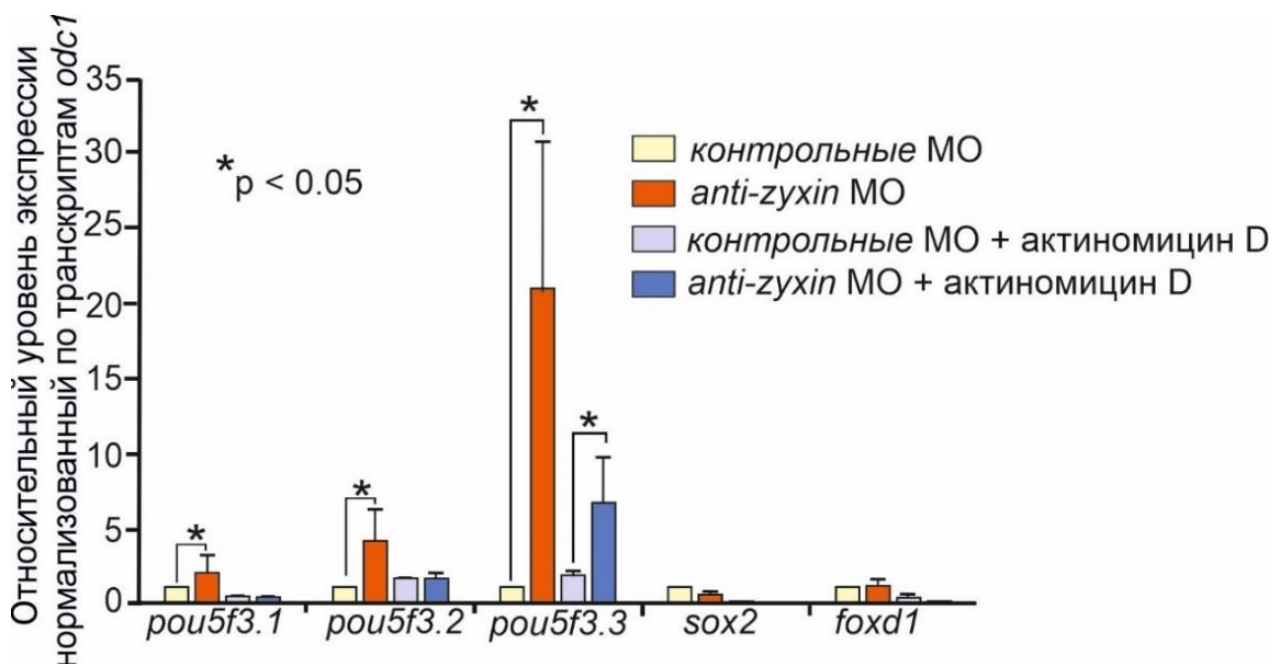
*rou5f3.3*. Изменение активности активина А определялось по экспрессии генов, регулирующих клеточную адгезию и модулирование цитоскелета *ncam1* (neural cell adhesion molecule 1), *tubb2b* (tubulin beta 2B class IIb), *actc1* (actin, alpha, cardiac muscle 1) и мезодермальных генов *not* (notochord homeobox) и *myod1* (myogenic differentiation 1).



**Рисунок 27.** Zyxin влияет на дифференцировку эмбриональных клеток. Слева: анти-зиксиновые МО ингибируют активность активина А в анимальных шапочках: шапочки, обработанные активином А (10 нг / мл), вытягиваются на стадии 18. Шапочки, инъецированные мРНК *тус-rou5f3.3* (100 нг / мкл) или 0,3 мМ *anti-zyxin* МО не вытягиваются после обработки активином А на той же стадии. Справа: расчет процента удлинённых шапочек у животных после инъекции *anti-zyxin* МО или мРНК *тус-rou5f3.3* в трех независимых экспериментах.

#### 4.1 Механизм регуляции: контроль стабильности материнской мРНК

Для выяснения механизма была создана люциферазная репортерная плаزمида с промотором гена *rou5f3.3*. Анализ её активности показал, что нокдаун зиксина не влияет на транскрипцию гена *rou5f3.3*. Эксперимент с ингибитором транскрипции актиномицином D выявил истинную причину: при блокировке синтеза РНК повышенный уровень мРНК *rou5f3.3* сохранялся. Это прямо доказывает, что зиксин регулирует уровень гена, контролируя стабильность его материнской мРНК (Рисунок 28).



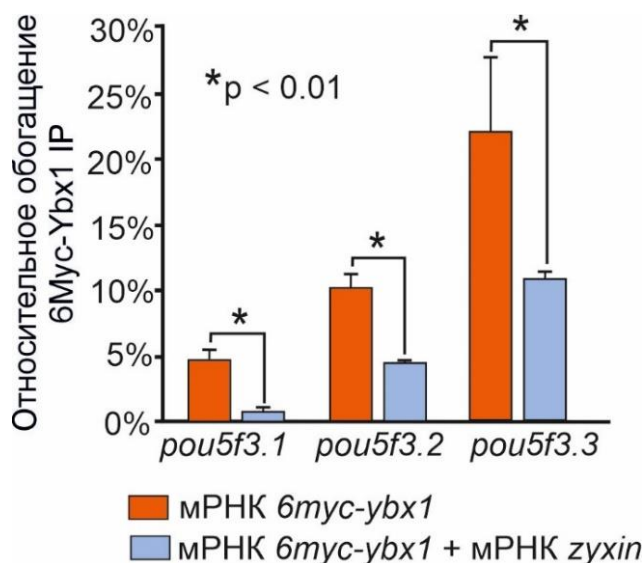
**Рисунок 28.** Нокдаун зиксина повышает стабильность материнской мРНК *pou5f3.3* в условиях ингибирования транскрипции. На гистограмме представлены результаты количественной ОТ-ПЦР (qRT-PCR), отражающие уровень мРНК в условиях глобальной блокады транскрипции актиномицином D. Показано влияние подавления зиксина на зиготические гены (*sox2*, *foxd1*, *pou5f3.1*, *pou5f3.2*) и материнский ген *pou5f3.3*. Введение актиномицина D подтверждено резким снижением транскриптов зиготических генов. При этом разница в уровне мРНК *pou5f3.3* между контрольной группой и группой с нокдауном зиксина сохраняется, что указывает на регуляцию скорости деградации (стабильности) материнского транскрипта.

Таким образом, зиксин выступает посттранскрипционным регулятором, который подавляет программу плюрипотентности, ускоряя деградацию мРНК ключевого фактора стволового статуса *pou5f3.3*. Снижение уровня зиксина стабилизирует эту мРНК, приводит к накоплению белка Pou5F3.3 и блокировке дифференцировки, что демонстрирует его новую роль в управлении клеточным состоянием на ранних этапах эмбриогенеза.

#### 4.2 Комплекс зиксин–Ybx1 контролирует стабильность мРНК генов плюрипотентности

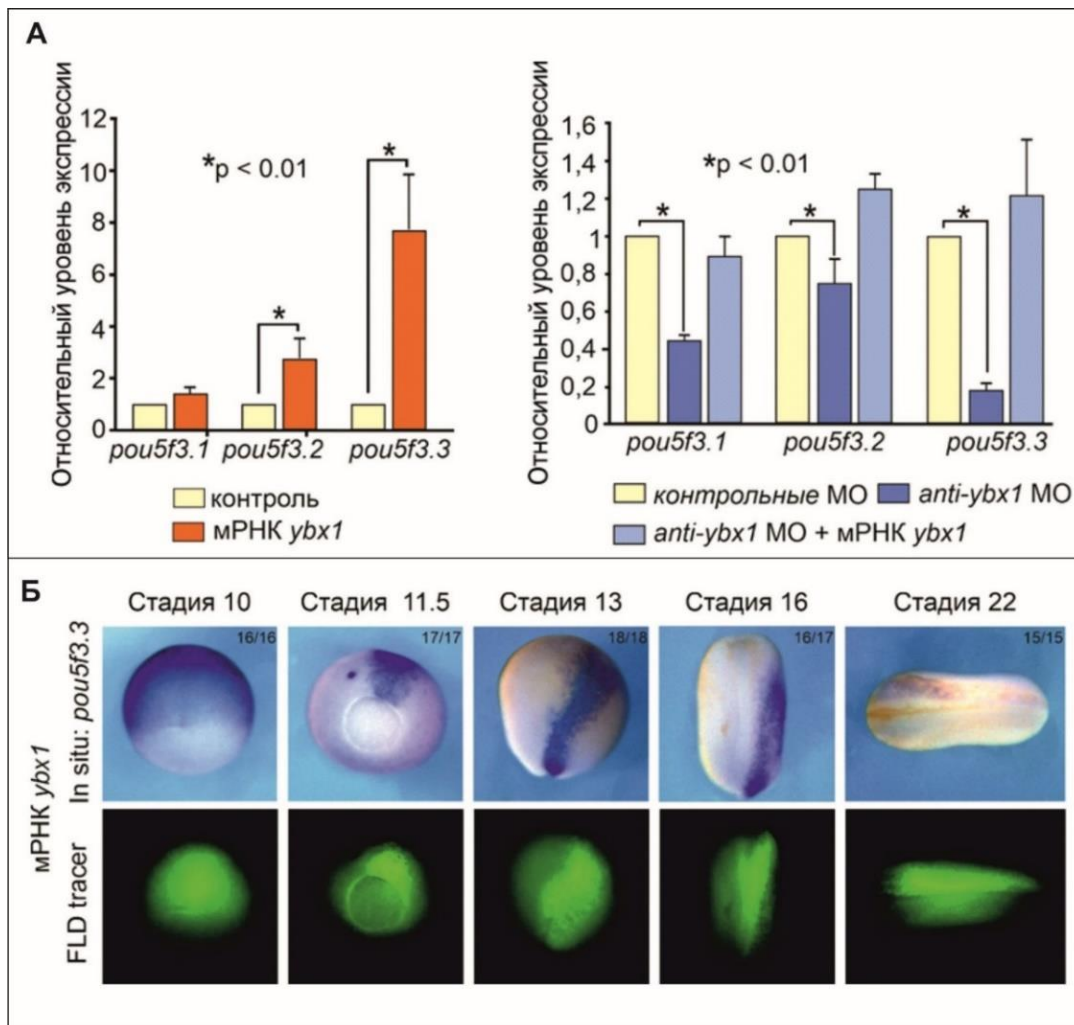
Было исследовано взаимодействие зиксина с РНК-связывающим белком Ybx1 (Y-box binding protein 1), обнаруженное ранее в двугибридном дрожжевом скрининге. Подтверждено, что комплекс образуется через C-концевую область зиксина и CTD доменом Ybx1. Ключевой эксперимент по РНК-иммунопреципитации (RIP) показал, что Ybx1 связывает мРНК генов семейства *pou5f3*, а коэкспрессия зиксина статистически значимо снижает

количество этой мРНК в комплексах (Рисунок 29). Это указывает, что зиксин ингибирует образование стабилизирующего комплекса Ybx1-мРНК.



**Рисунок 29.** Относительное обогащение мРНК генов *rou5f3* в иммунопреципитатах с 6musc-Ybx1. Коэкспрессия зиксина статистически значимо снижает уровень связывания всех трёх транскриптов (RIP-qPCR).

Исследование функциональной роли Ybx1 показало, что изменение его уровня напрямую регулирует стабильность мРНК *rou5f3*. Оверэкспрессия Ybx1 повышала уровень этих транскриптов, имитируя эффект нокдауна зиксина, а ингибирование Ybx1, напротив, снижало его. Восстановление экспрессии *ybx1* возвращало уровни мРНК *rou5f3* к норме (Рисунок 30, А). Данные были подтверждены методом гибридизации *in situ* (WISH), который также показал, что вызванное Ybx1 увеличение уровня мРНК *rou5f3.3* является более стабильным и сохраняется на поздних стадиях развития (Рисунок 30). Для изучения влияния Ybx1 на стабильность мРНК *rou5f3* мы изменили его уровень в клетках эмбрионов. Оверэкспрессия *ybx1* (50 нг/мкл мРНК) на стадии ранней нейрулы значительно повышала уровень транскриптов всех трёх генов *rou5f3*, подобно эффекту нокдауна зиксина. И наоборот, ингибирование трансляции мРНК *ybx1* антисмысловым морфолино снижало их количество. Восстановление экспрессии *ybx1* возвращало уровни мРНК *rou5f3* к норме (Рисунок 30, А). Данные были подтверждены методом гибридизации *in situ* (WISH). Локальная оверэкспрессия Ybx1 в правом дорсальном бластомере приводила к увеличению уровня мРНК *rou5f3.3*, причём этот эффект, в отличие от подавления зиксина, сохранялся до более поздних стадий развития, включая стадию хвостовой почки (стадия 22) (Рисунок 30, Б).



**Рисунок 30.** Влияние уровня белка Ybx1 на количество мРНК генов *pou5f3*. **А.** qRT-PCR анализ: оверэкспрессия Ybx1 повышает, а морфолино-нокдаун — снижает уровень мРНК *pou5f3.1*, *pou5f3.2* и *pou5f3.3* на стадии нейрулы. Эффект нокдауна компенсируется коинъекцией мРНК Ybx1 (эффект «спасения»). **В.** Гибридикация *in situ*: локальная оверэкспрессия Ybx1 (помечена FLD) приводит к устойчивому повышению уровня мРНК *pou5f3.3*, аналогичному эффекту нокдауна зиксина (Рисунок 24), но сохраняющемуся до более поздней стадии хвостовой почки (стадия 22).

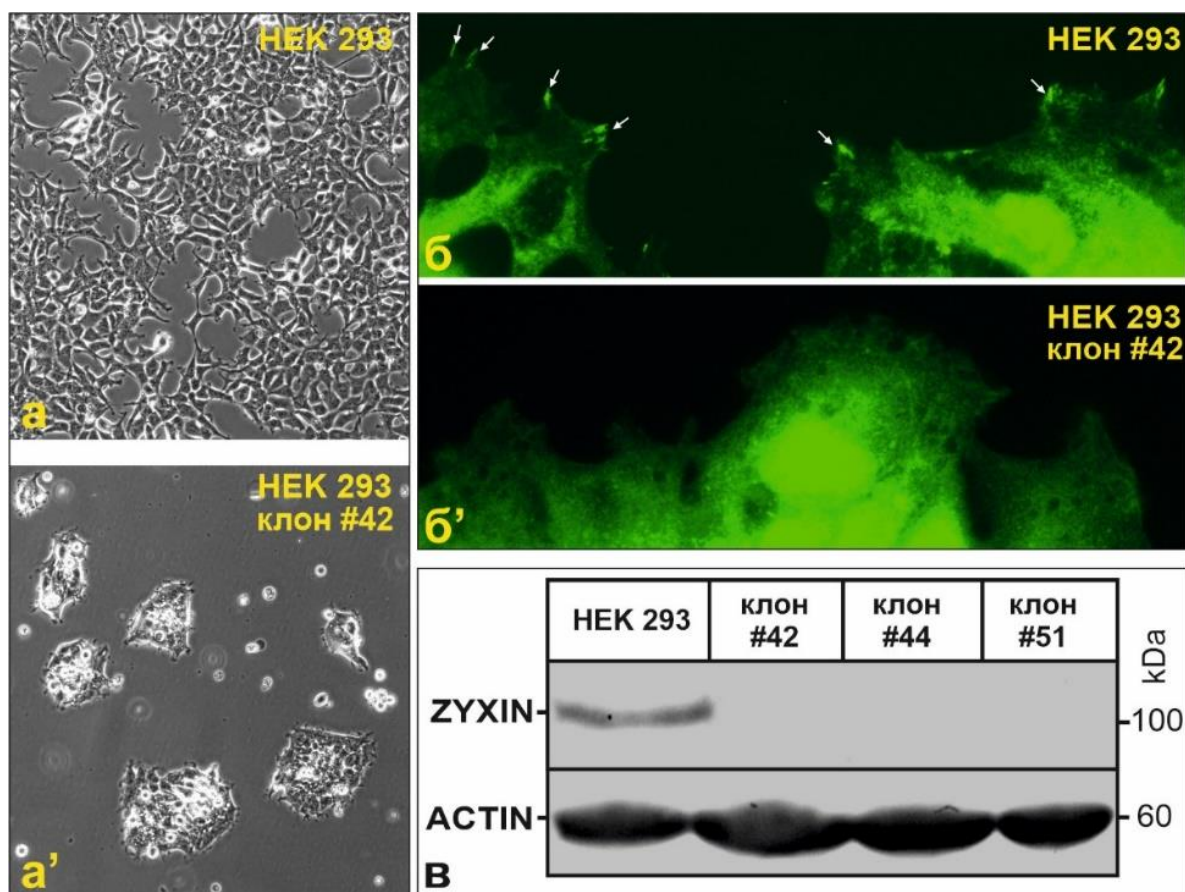
Этот эффект, как и в случае подавления зиксина, не был связан с изменением уровня транскрипции этих генов, что подтверждено с использованием люциферазного репортерного вектора с промотором гена *pou5f3.3*.

Таким образом, предложен механизм, при котором зиксин регулирует стабильность мРНК генов плюрипотентности через прямое взаимодействие с Ybx1. Связываясь с ним, зиксин ингибирует формирование стабильного комплекса Ybx1-мРНК, запуская деградацию транскриптов. Зиксин и Ybx1 действуют как негативный и позитивный регуляторы в этом

посттранскрипционном механизме, контролирующем переход к дифференцировке.

### 4.3 Эволюционная консервативность механизма: подавление зиксина активирует гены плюрипотентности у *Danio rerio* и в клетках человека HEK293

Для проверки эволюционной консервативности механизма регуляции генов плюрипотентности через комплекс зиксин–Ybx1 исследования были проведены на двух моделях: В клетках человека: с помощью системы CRISPR/Cas9 созданы стабильные линии HEK293 с нокаутом гена *ZYXIN*. Полученные клоны демонстрировали аномальный фенотип (увеличение доли округлых, слабо прикрепленных клеток, Рисунок 31, а, а', в) и значительное снижение уровня белка зиксина, что было подтверждено иммунофлуоресценцией и вестерн-блоттингом (Рисунок 31, б, б').

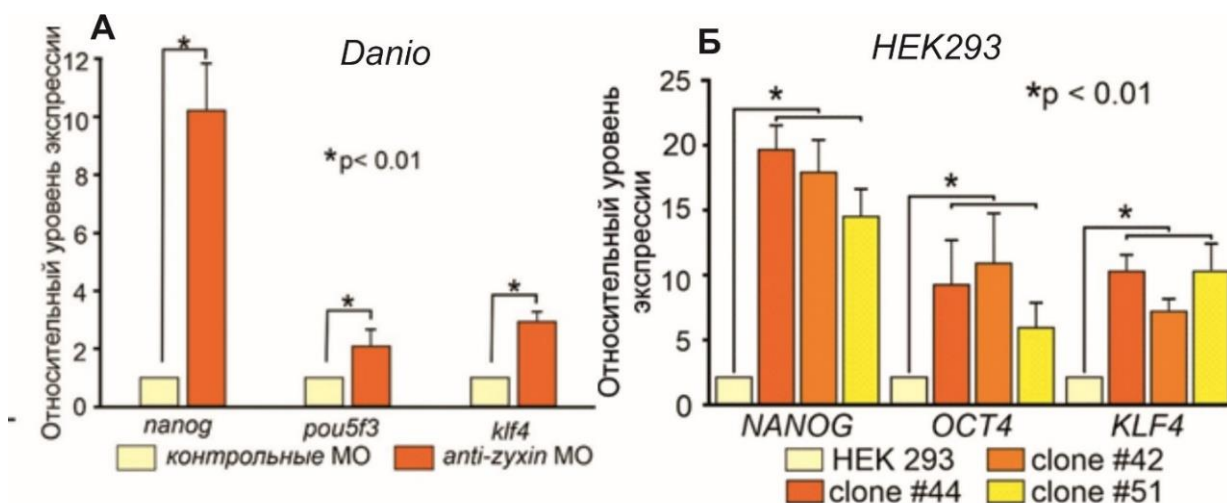


**Рисунок 31.** Создание и характеристика клеточных линий HEK293 с нокаутом гена *ZYXIN*. А, А': Морфология клеток. (А) Контрольные клетки HEK293, трансфицированные пустым вектором. (А') Клон клеток HEK293 с нокаутом *ZYXIN*, демонстрирующий аномальный фенотип: увеличение доли округлых, слабо

прикрепленных клеток. **Б, Б'**: Анализ экспрессии и локализации белка. (**Б**) Иммунофлуоресцентное окрашивание контрольных клеток HEK293 с антителами против зиксина; стрелки указывают на типичную локализацию белка в адгезивных комплексах. (**Б'**) Окрашивание клона с нокаутом *ZYXIN*: сигнал зиксина значительно снижен или отсутствует.

**В:** Вестерн-блоттинг. Анализ экспрессии белка зиксина в контрольных клетках и в отобранных клонах с предполагаемым нокаутом (клоны 42, 44, 51). Показано значительное снижение уровня зиксина в клонах по сравнению с контролем. В качестве контроля нагрузки использован  $\beta$ -актин.

Секвенирование полученных клонов подтвердило наличие в целевых локусах инделей, приводящих к сдвигу рамки считывания. Количественный ОТ-ПЦР анализ транскриптома этих линий показал статистически значимое увеличение уровня мРНК ключевых факторов плюрипотентности *NANOG*, *POU5F1/OCT4* и *KLF4* во всех протестированных клонах по сравнению с контролем (Рисунок 32 Б). На эмбрионах *Danio rerio*: нокадаун гена *zyxin* с помощью морфолино вызывал значительное и устойчивое повышение уровня мРНК генов *nanog*, *pou5f3* и *klf4* в период гаструляции–хвостовой почки. Этот эффект противоположен нормальной динамике, для которой характерно резкое снижение материнских транскриптов уже к средней бластуле. (Рисунок 32 А).

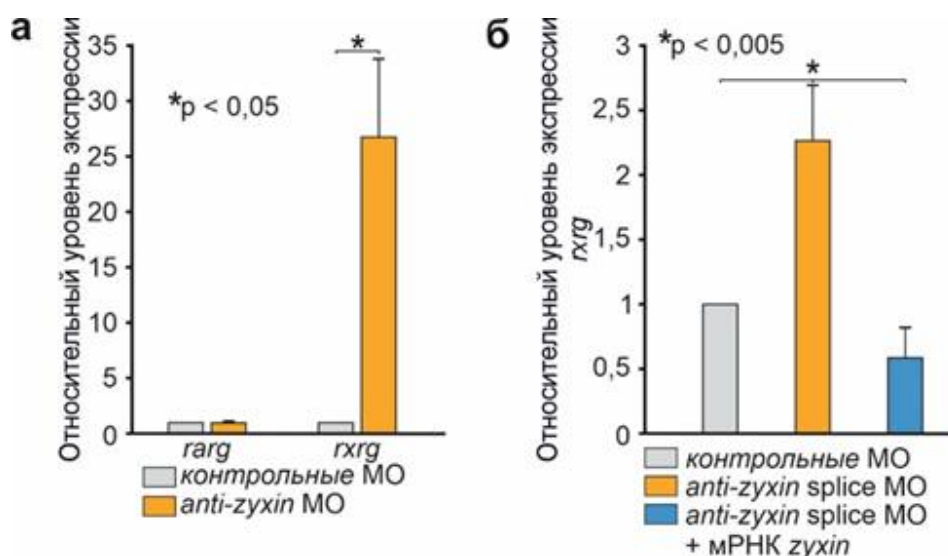


**Рисунок 32. А.** Результаты qRT-PCR на стадии хвостовой почки (10-10.3 hpf) эмбрионов *Danio rerio* с нокадауном зиксина. Инъекция морфолино (0.3 мМ) к зиксину приводит к значительному увеличению уровня мРНК генов *panog*, *pou5f3* и *klf4* по сравнению с контролем (инъекция контрольного МО). **Б.** Активация генов плюрипотентности в клетках HEK293 с нокаутом *ZYXIN*. Результаты qRT-PCR показывают статистически значимое увеличение уровня мРНК генов *NANOG*, *KLF4* и *\*POU5F1/OCT4\** в трёх стабильных клонах (42, 44, 51) по сравнению с контролем.

Совокупность этих данных, полученных *in vivo* на эмбрионе позвоночного и *in vitro* на человеческих клетках, однозначно подтверждает, что открытый механизм регуляции стабильности мРНК через комплекс зиксин–Ybx1 является эволюционно консервативным и функционирует в клетках млекопитающих, включая человека. Это подчёркивает его фундаментальное значение в контроле баланса между плюрипотентностью и началом дифференцировки.

## 5. Влияние зиксина на экспрессию гена рецептора ретиноидов RXR $\gamma$

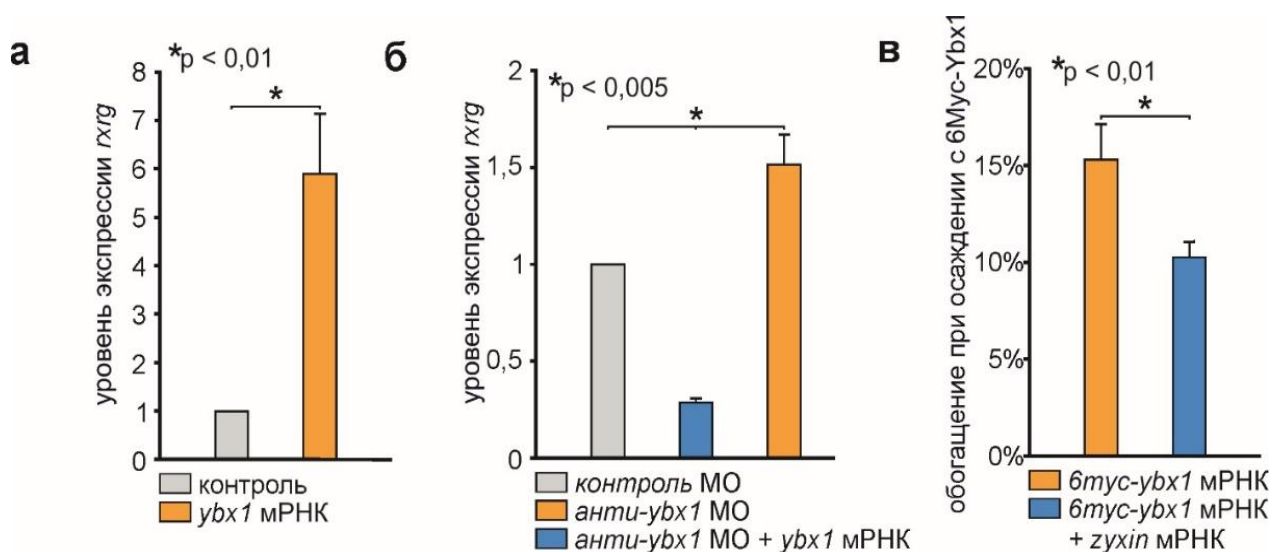
Анализ данных NGS показал, что нокдаун зиксина специфически увеличивает уровень мРНК гена ретиноидного рецептора *rxrg* (но не *rarg*, см. Рисунок 23 и 33 А). На специфичность этого увеличения указывает эффект «спасения»: при ко-инъекции мРНК зиксина уровень мРНК *rxrg* восстанавливается (Рисунок 33 Б). Поскольку *rxrg* является материнским геном, проверена гипотеза об общем механизме регуляции через Ybx1.



**Рисунок 33.** Нокдаун зиксина приводит к увеличению количества транскриптов *rxrg*. **А** - Подтверждение данных NGS методом qRT-PCR. **Б** - Восстановление нормальной экспрессии зиксина приводит к сохранению нормального уровня мРНК *rxrg*.

Эксперименты подтвердили, что изменение уровня Ybx1 напрямую влияет на количество мРНК *rxrg* (Рисунок 34 А,Б). По данным РНК-иммунопреципитации (RIP), мРНК *rxrg* специфически обогащается в комплексах с Ybx1. Совместная экспрессия зиксина значительно снижает это обогащение, что указывает на его ингибирующую роль в формировании стабильного комплекса Ybx1-мРНК *rxrg* (Рисунок 34 В). Таким образом,

ингибирующий комплекс зиксин–Ybx1 контролирует стабильность более широкого спектра материнских мРНК, включая ключевой сигнальный ген *rxrg*.

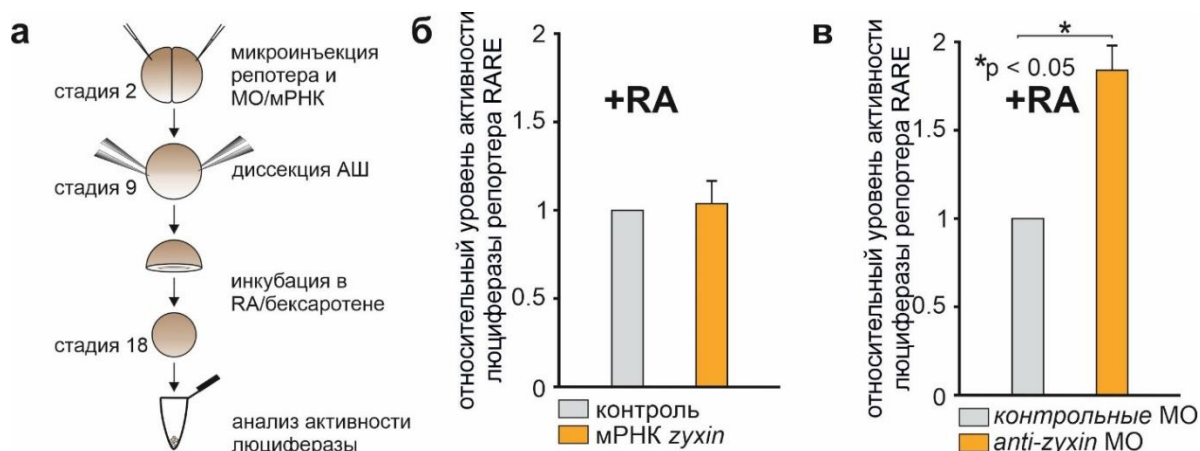


**Рисунок 34.** Регуляция уровня мРНК *rxrg* комплексом зиксин-Ybx1. **А.** Влияние изменения уровня Ybx1. **Б** Результаты qRT-PCR, показывающие влияние Ybx1 на уровень мРНК *rxrg*. Совместная инъекция анти-Ybx1 МО и мРНК Ybx восстанавливает нормальный уровень экспрессии («спасение»). **В.** Связывание мус-Ybx1 с мРНК *rxrg* и влияние зиксина. Результаты РНК-иммунопреципитации (RIP). График демонстрирует значительное обогащение мРНК *rxrg* в иммунопреципитатах с анти-мус антителами по сравнению с контролем. Совместная экспрессия зиксина существенно снижает количество мРНК *rxrg*, ассоциированной с Ybx1, что указывает на ингибирующую роль зиксина в формировании комплекса Ybx1-мРНК.

### 5.1 Влияние зиксина на транскрипционную активность ретиноидных рецепторов

Для прямого исследования влияния зиксина на сигнализацию ретиноевой кислоты (RA) были созданы репортерные люциферазные конструкции, содержащие тандемные повторы цис-регуляторных элементов, чувствительных к ретиноидным рецепторам. В результате анализа люциферазной активности в присутствии ретиноевой кислоты (RA) нокаун зиксина приводил к статистически значимому повышению RA-индуцированной активности репортера, в то время как оверэкспрессия зиксина изменений не вызывала. Этот результат указывает, что эндогенный зиксин выполняет репрессорную функцию в каноническом пути за счет

влияния на гетеродимерный комплекс рецепторов  $RAR\gamma/RXR\gamma$ , но только в контексте активного, лиганд-связанного состояния рецепторов (Рисунок 35).



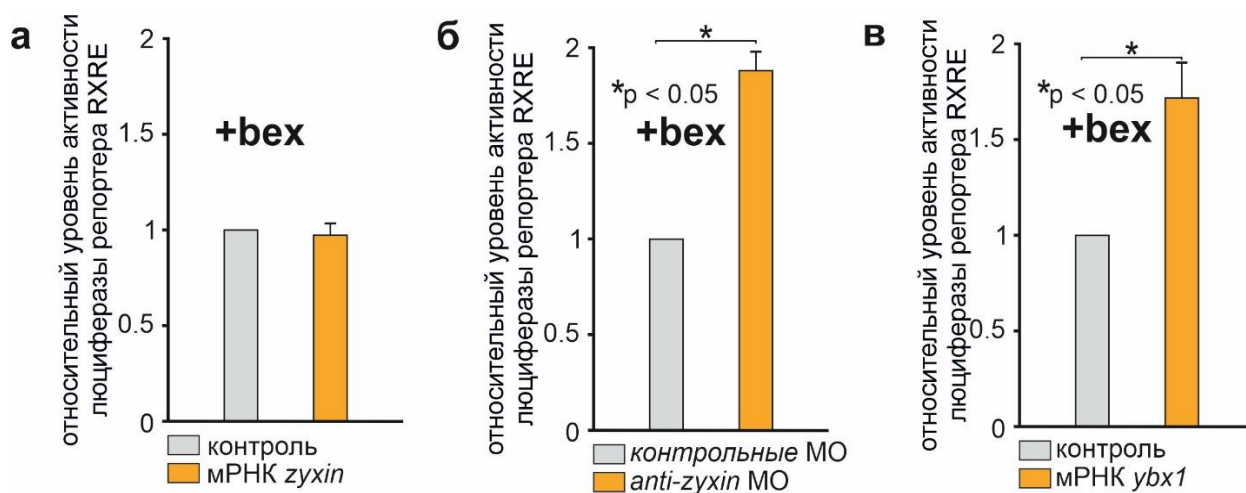
**Рисунок 35.** Репрессорная функция зиксина в активированном ретиноидном сигналинге.

**А.** Схема эксперимента с репортером pGL3-3xRARE на эксплантатах животных шапочек, обработанных RA.

**Б, В.** Оверэкспрессия зиксина не влияет на активность репортера, в то время как его нокдаун вызывает значительное усиление ответа на RA. Это демонстрирует, что эндогенный зиксин является репрессором канонического пути RAR/RXR в присутствии лиганда.

Поскольку уровень  $RAR\gamma$  не менялся при нокдауне зиксина, а мишенью мог быть альтернативный путь, была исследована сигнализация через гомодимеры рецептора  $RXR\gamma$ . Для этого использовали специфичный репортер pGL3-2x $\gamma$ RXRE, который активировался агонистом RXR бексаротеном, но не отвечал на RA. В этих условиях оверэкспрессия зиксина также не изменяла активности репортера (Рисунок 36 А), а нокдаун зиксина вызывал усиление этой активности (Рисунок 36 Б). Важно, что оверэкспрессия *Ybx1* имитировала эффект усиления репортерной активности при подавлении зиксина (Рисунок 36 В), что согласуется с моделью их антагонистического действия.

Таким образом, зиксин выступает негативным регулятором транскрипции, управляемой как гетеродимерами RAR/RXR (через RARE), так и гомодимерами RXR (через  $\gamma$ RXRE), но только при активации пути лигандом. Этот репрессорный эффект дополняет открытый ранее механизм контроля зиксином стабильности мРНК гена *rxrg* через взаимодействие с *Ybx1*.



**Рисунок 36.** Влияние уровня зиксина и Ybx1 на RXR-опосредованную транскрипцию в условиях активации бексаротеном. Во всех панелях представлены результаты измерения нормализованной люциферазной активности репортерной конструкции рGL3-2xγRXRE в эксплантатах анимальных шапочек (АШ) после обработки специфическим агонистом рецепторов RXR – бексаротеном ( $10^{-5}$  М). **А.** Влияние оверэкспрессии зиксина. Сравнивается активность в АШ, инъецированных мРНК зиксина, и в неинъецированных контрольных АШ. **Б.** Влияние нокдауна зиксина. Сравнивается активность в АШ, инъецированных антисмысловыми морфолино против зиксина (*anti-zyxin* МО, нокдаун), и в АШ, инъецированных контрольными МО. **В.** Влияние оверэкспрессии Ybx1. Сравнивается активность в АШ, инъецированных мРНК *ybx1*, и в неинъецированных контрольных АШ. Оверэкспрессия Ybx1 вызывает достоверное увеличение активности репортера.

### 6. Анализ репертуара мРНК, ассоциированных с Ybx1 в зависимости от уровня зиксина (RIP-seq)

Для полногеномной идентификации мишеней комплекса зиксин–Ybx1 был применён метод RIP-seq с использованием антител к эндогенному Ybx1 на эмбрионах с нокдауном зиксина и контрольных эмбрионах.

Биоинформатический анализ выявил гены с изменённым связыванием с Ybx1 при подавлении зиксина, а последующая поэтапная экспериментальная проверка методом qRT-PCR и WISH при модуляции уровней зиксина и Ybx1 позволила отобрать четыре ключевых гена: *crx* (*otx5*), *cer1*, *foxn3* и *mix1*.

Функциональная характеристика показала, что все они кодируют критически важные компоненты головного организатора эмбриона: Crx (Otx5) – транскрипционный фактор, необходимый для развития переднего мозга и дифференцировки фоторецепторов сетчатки. Foxn3 – транскрипционный фактор, участвующий в формировании глаз и черепных нервов.

Mix1 – ключевой регулятор дорсо-вентральной спецификации мезодермы, прямой активатор гена *cer1*. Cer1 – секретлируемый антагонист сигнальных путей BMP, Wnt и Nodal, обеспечивающий нейральную индукцию. Эти гены, кодирующие транскрипционные факторы и морфогены головного организатора, показали согласованное повышение стабильности мРНК при дефиците зиксина. Результат доказывает, что открытый механизм регулирует широкий репертуар мРНК, включая критические зиготические гены, управляющие формированием переднего мозга и дорсо-вентральной спецификацией.

## **7. Масс-спектрометрический анализ белковых взаимодействий зиксина в раннем эмбриогенезе *Xenopus laevis***

В данной работе методом ко-иммунопреципитации с антителами к зиксину в сочетании с количественной масс-спектрометрией (методами DDA и DIA) впервые проведен системный анализ динамики интерактома зиксина на трех ключевых стадиях раннего эмбриогенеза *X. laevis* (гаструла, ранняя и поздняя нейрула). Установлено, что интерактом зиксина имеет двухкомпонентную архитектуру: стабильное структурное ядро из белков талин, винкулин, актин, обеспечивающее интеграцию в адгезионные комплексы, и динамическая регуляторная периферия. Состав периферии стадийноспецифичен: в период нейруляции наблюдается усиленная рекрутировка  $\alpha$ -актининов и миозина II, что соответствует потребностям активного ремоделирования цитоскелета на этой стадии.

Подтверждены и охарактеризованы по стадиям развития ранее предсказанные взаимодействия зиксина с регуляторами транскрипции: взаимодействие с Y-бокс белками (Ybx1, 2) максимально на стадиях гаструлы и ранней нейрулы. Взаимодействие с транскрипционным фактором Gli1 пути Hedgehog специфично возникает на стадии поздней нейрулы. Также этим методом выявлены стадийно-специфические ассоциации зиксина с компонентами сигнальных путей (киназы АКТ, CDK), регуляторами апоптоза (каспаза-3) и механочувствительным ко-активатором транскрипции YAP1.

Полученные данные раскрывают функцию зиксина как динамического механосенсора, способного тонко настраиваться на разных уровнях: за счёт

перестройки состава белковых комплексов и через стадийно-специфическую систему фосфорилирования. Эта многоуровневая регуляция позволяет зиксину интегрировать механические стимулы, сигнальные пути и транскрипционные программы в соответствии с задачами каждого этапа морфогенеза.

## **ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ**

1. Впервые у *Xenopus laevis* клонирован и охарактеризован ген зиксина, доказана его высокая консервативность среди позвоночных и специфическая экспрессия с максимумом в передней части нервной пластинки на ранних стадиях развития.
2. Установлено прямое физическое взаимодействие зиксина с транскрипционным репрессором *Xanf1*, опосредованное вторым LIM-доменом зиксина и EH1-доменом *Xanf1*. Показано, что это взаимодействие необходимо для нормального морфогенеза переднего мозга и может служить механизмом переключения активности *Xanf1* с репрессии на активацию в зависимости от контекста.
3. Обнаружено, что зиксин взаимодействует с ключевыми компонентами сигнального пути Hedgehog (*Gli1*, *Zic1*, *Ptc2*). Функциональные данные свидетельствуют, что зиксин оказывает подавляющее влияние на этот путь в дорсальной части нервной трубки, участвуя в установлении границ экспрессии генов-мишеней.
4. Раскрыт новый механизм посттранскрипционной регуляции, при котором зиксин за счет взаимодействия с РНК-связывающим белком *Ybx1* препятствует стабилизации мРНК ключевых регуляторов плюрипотентности (*pou5f3.3*) и развития (*rxrg*).
5. Доказано, что зиксин является негативным регулятором сигнального пути ретиноевой кислоты, действуя через два взаимодополняющих механизма: снижение стабильности мРНК рецептора RXR $\gamma$  и ингибирование лиганд-зависимой транскрипционной активности.
6. Многоступенчатый скрининг методом RIP-seq позволили идентифицировать спектр зиготических генов-мишеней комплекса *Ybx1*/зиксин, включая гены головного организатора (*crx/otx5*, *mix1*, *foxn3*, *cer1*), что подтверждает участие данного механизма в регуляции формирования переднего мозга и основных осей тела.

7. Работа устанавливает зиксин как ключевой механорегуляторный «хаб». Способность интегрировать сигналы обеспечивается двухуровневой архитектурой его интерактома и стадийно-специфическим кодом фосфорилирования. Это позволяет зиксину координировать морфогенез, управляемый цитоскелетом, с перестройкой транскриптома, направляющей клеточную дифференцировку.

#### **ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Parshina, E.A., Ziganshin, R.H., Zarausky, A.G., **Martynova, N.Y.** Co-Immunoprecipitation-Coupled Mass Spectrometry Analysis of Zyxin's Interactome and Phosphosites in Early *Xenopus laevis* Development. *Int. J. Mol. Sci.* 2026, 27, 738. <https://doi.org/10.3390/ijms27020738>
2. 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., Zarausky A.G., **Martynova N.Y.** Cytoskeletal Protein Zyxin Inhibits the Activity of Genes Responsible for Embryonic Stem Cell Status. *Cell Reports.* 2020, 33(7), 108396. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108396.
3. **Martynova N.Y.**, Parshina E.A., Zarausky A.G. Cytoskeletal protein Zyxin in embryonic development: from controlling cell movements and pluripotency to regulating embryonic patterning. *FEBS Journal.* 2023, 290(1), 66–72. DOI: 10.1111/febs.16308.
4. Parshina E.A., Orlov E.E., Zarausky A.G., **Martynova N.Y.** The Cytoskeletal Protein Zyxin Inhibits Retinoic Acid Signaling by Destabilizing the Maternal mRNA of the RXR $\gamma$  Nuclear Receptor. *International Journal of Molecular Sciences.* 2022, 23(10), 5627. DOI: 10.3390/ijms23105627.
5. **Martynova N.Y.**, Parshina E.A., Ermolina L.V., Zarausky A.G. The cytoskeletal protein Zyxin interacts with the zinc-finger transcription factor Zic1 and plays the role of a scaffold for Gli1 and Zic1 interactions during early development of *Xenopus laevis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2018, 504(1), 251–256. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.08.164.
6. **Martynova N.Y.**, Ermolina L.V., Ermakova G.V., Eroshkin F.M., Gyoeva F.K., Baturina N.S., Zarausky A.G. The cytoskeletal protein Zyxin inhibits Shh signaling during the CNS patterning in *Xenopus laevis* through interaction with the transcription factor Gli1. *Developmental Biology.* 2013, 380(1), 37–48. DOI: 10.1016/j.ydbio.2013.05.005.
7. **Martynova N.Y.**, Eroshkin F.M., Ermolina L.V., Ermakova G.V., Korotaeva A.L., Smurova K.M., Gyoeva F.K., Zarausky A.G. The LIM-domain protein zyxin binds the homeodomain factor Xanfl/Hesx1 and modulates its activity in the anterior

neural plate of *Xenopus laevis* embryo. *Developmental Dynamics*. 2008, 237(3), 736–749. DOI: 10.1002/dvdy.21471.

8. **Martynova N.Y.**, Parshina E.A., Zاراisky A.G. Protocol for separation of the nuclear and the cytoplasmic fractions of *Xenopus laevis* embryonic cells for studying protein shuttling. *STAR Protocols*. 2021, 2(2), 100449. DOI: 10.1016/j.xpro.2021.100449.

9. **Martynova N.Y.**, Parshina E.A., Zاراisky A.G. Using RNA-binding proteins for immunoprecipitation of mRNAs from *Xenopus laevis* embryos. *STAR Protocols*. 2021, 2(3), 100689. DOI: 10.1016/j.xpro.2021.100552.

10. Паршина Е.А., Зарайский А.Г., **Мартынова Н.Ю.** Роль материнского гена *rou5f3.3/oct60* в регуляции начальных этапов дифференцировки тканей в эмбриогенезе шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. *Биоорганическая химия*. 2020, 46(6), 719–728 DOI: 10.31857/S013234232006024X

11. Паршина Е.А., Иванова Э.И., Зарайский А.Г., **Мартынова Н.Ю.** Влияние модификаций цитоскелетного белка зиксина на его внутриклеточное распределение на модели эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. *Биоорганическая химия*. 2025, 51(2), 329–341. DOI: 10.1134/S1068162024605755.

12. Иванова Э.Д., Паршина Е.А., Зарайский А.Г., **Мартынова Н.Ю.** Изоформы цитоскелетного белка зиксина в раннем эмбриогенезе шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. *Биоорганическая химия*. 2024, 50(3), 287–294. DOI: 10.31857/S0132342324030077

13. Паршина Е.А., Зарайский А.Г., **Мартынова Н.Ю.** Фактор рибонуклеопротеиновых комплексов *Ybx1* стабилизирует материнскую мРНК гена *ssx2ip*, кодирующего белок созревания centrosom, в эмбриональном развитии лягушки *Xenopus laevis*. *Биоорганическая химия*. 2024, 50(3), 338–344. DOI: 10.31857/S0132342324030133.

14. Parshina, E.A., Orlov, E.E., Voronezhskaya, E.E., **Martynova N.Y.**, Zاراisky A.G. Cytoskeletal Regulator Zyxin Stimulates Nuclear Translocation of YAP in *Xenopus laevis* Embryonic Cells. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2025, 51, pp. 1945–1953. doi.org/10.1134/S1068162025601727

15. Иванова Э.Д., Зиганшин Р.Х., Паршина Е.А., Зарайский А.Г., **Мартынова Н.Ю.** Масс-спектрометрический анализ посттрансляционных модификаций цитоскелетного белка зиксина из *Xenopus laevis*. *Биоорганическая химия*. 2025, 51(3), 388–397. DOI: 10.31857/S0132342325030027.

16. Паршина Е.А., Зарайский А.Г., **Мартынова Н.Ю.** Регуляция стабильности транскриптов гена плюрипотентности семейства *rou5f3* рибонуклеопротеиновыми комплексами *Ybx1* на ранних этапах развития *Xenopus laevis*. *Биоорганическая химия*. 2025, 51(3), 486–495. DOI: 10.31857/S0132342325030113.

17. Паршина Е.А., Зарайский А.Г., **Мартынова Н.Ю.** Транскриптомный анализ влияния уровня цитоскелетного белка зиксина на процессы метаболизма и сигнальные пути на модели эмбрионов шпорцевой лягушки. *Биоорганическая химия*. 2025, 51(5), 1–9. DOI: 10.1134/S1068162025601983.
18. **Мартынова Н.Ю.**, Паршина Е.А., Eroshkin F.M., Зарайский А.Г. Цитоскелетный белок зиксин модулирует экспрессию генов-мишеней Shh сигнального каскада в клетках нервной пластинки эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. *Биоорганическая химия*. 2020, 46(4), 396–403. DOI: 10.31857/S013234232004020X
19. **Мартынова Н.Ю.**, Ермолина Л.В., Eroshkin F.M., Зарайский А.Г. Цитоскелетный белок зиксин взаимодействует с рецептором Ptc фактора Hh, инициирующего сигнальный каскад hedgehog. *Биоорганическая химия*. 2015, 41(6), 669–673. DOI: 10.7868/S013234231506010X.
20. **Мартынова Н.Ю.**, Eroshkin F.M., Зарайский А.Г. Влияние гетеродимерного комплекса транскрипционных факторов SoxD (Sox15) и Xanf1 на формирование зоны экспрессии гена *xanf1* в раннем развитии переднего мозга у шпорцевой лягушки. *Биоорганическая химия*. 2018, 44(3), 353–356. DOI: 10.7868/S0132342318030132
21. **Мартынова Н.Ю.**, Ермолина Л.В., Eroshkin F.M., Гиоева Ф.К., Зарайский А.Г. Транскрипционный фактор Xanf1 взаимодействует с белком фокальной адгезии Zyxin в раннем развитии мозга *Xenopus laevis*. *Биоорганическая химия*. 2008, 34(4), 573–576. DOI: 10.1134/s1068162008040183
22. Ермолина Л.В., **Мартынова Н.Ю.**, Зарайский А.Г. Цитоскелетный белок зиксин – универсальный регулятор клеточной адгезии и генной экспрессии. *Биоорганическая химия*. 2010, 36(1), 29–37.
23. **Martynova N.**, Eroshkin F., Ermakova G., Bayramov A., Gray J., Grainger R., Zاراisky A. Patterning the forebrain: FoxA4a/Pintallavis and Xvent2 determine the posterior limit of Xanf1 expression in the neural plate. *Development*. 2004, 131(10), 2329–2338. DOI: 10.1242/dev.01133.
24. Bayramov A.V., Eroshkin F.M., **Martynova N.Y.**, Ermakova G.V., Solovieva E.A., Zاراisky A.G. Novel functions of Noggin proteins: Inhibition of Activin/Nodal and Wnt signaling. *Development*. 2011, 138(24), 5345–5356. DOI: 10.1242/dev.068908.
25. Eroshkin F.M., Nesterenko A.M., Borodulin A.V., **Martynova N.Y.**, Ermakova G.V., Gyoeva F.K., Orlov E.E., Belogurov A.A., Lukyanov K.A., Bayramov A.V., Zاراisky A.G. Noggin4 is a long-range inhibitor of Wnt8 signalling that regulates head development in *Xenopus laevis*. *Scientific Reports*. 2016, 6, 23049. DOI: 10.1038/srep23049.
26. Bayramov A.V., Ermakova G.V., Eroshkin F.M., Kucheryavyu A.V., **Martynova N.Y.**, Zاراisky A.G. The presence of Anf/Hesx1 homeobox gene in lampreys

suggests that it could play an important role in emergence of telencephalon. *Scientific Reports*. 2016, 6, 39849. DOI: 10.1038/srep39849.

27.Orlov E.E., Nesterenko A.M., Parshina E.A., **Martynova N.Y.**, Zaraisky A.G. Targeted search for scaling genes reveals matrix metalloproteinase 3 as a scaler of the dorsal-ventral pattern in *Xenopus laevis* embryos. *Developmental Cell*. 2022, 57(1), 95–111.e12. DOI: 10.1016/j.devcel.2021.11.021.

28.Ivanova A.S., Tereshina M.B., Araslanova K.R., **Martynova N.Y.**, Zaraisky A.G. The Secreted Protein Disulfide Isomerase Ag1 Lost by Ancestors of Poorly Regenerating Vertebrates Is Required for *Xenopus laevis* Tail Regeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021, 9, 738940. DOI: 10.3389/fcell.2021.738940.

29.Ivanova A.S., Korotkova D.D., Ermakova G.V., **Martynova N.Y.**, Zaraisky A.G., Tereshina M.B. Ras-dva small GTPases lost during evolution of amniotes regulate regeneration in anamniotes. *Scientific Reports*. 2018, 8(1), 13035. DOI: 10.1038/s41598-018-30811-0.

30.Ermakova G.V., Solovieva E.A., **Martynova N.Y.**, Zaraisky A.G. The homeodomain factor Xanf represses expression of genes in the presumptive rostral forebrain that specify more caudal brain regions. *Developmental Biology*. 2007, 307(2), 483–497. DOI: 10.1016/j.ydbio.2007.03.524.

31.Bayramov A.V., **Martynova N.Y.**, Eroshkin F.M., Ermakova G.V., Zaraisky A.G. The homeodomain-containing transcription factor X-nkx-5.1 inhibits expression of the homeobox gene Xanf-1 during the *Xenopus laevis* forebrain development. *Mechanisms of Development*. 2004, 121(12), 1425–1441. DOI: 10.1016/j.mod.2004.08.002.

32.Eroshkin F., Kazanskaya O., **Martynova N.**, Zaraisky A. Characterization of cis-regulatory elements of the homeobox gene Xanf-1. *Gene*. 2002, 285(1-2), 279–286. DOI: 10.1016/S0378-1119(02)00393-1.

33.Korotkova D.D., Gantsova E.A., Goryashchenko A.S., Eroshkin F.M., Serova O.V., Sokolov A.S., Sharko F., Zhenilo S.V., **Martynova N.Y.**, Petrenko A.G., Zaraisky A.G., Deyev I.E. Insulin Receptor-Related Receptor Regulates the Rate of Early Development in *Xenopus laevis*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, 23(16), 9250. DOI: 10.3390/ijms23169250.

34.Tereshina M.B., Ivanova A.S., Eroshkin F.M., Korotkova D.D., Nesterenko A.M., Bayramov A.V., Solovieva E.A., Parshina E.A., Orlov E.E., **Martynova N.Y.**, Zaraisky A.G. Agr2-interacting Prod1-like protein Tfp4 from *Xenopus laevis* is necessary for early forebrain and eye development as well as for the tadpole appendage regeneration. *Genesis*. 2019, 57(5), e23293. DOI: 10.1002/dvg.23293.

35.Ivanova A.S., **Martynova N.Y.**, Komarov P.A., Orlov E.E., Ermakova G.V., Zaraisky A.G., Tereshina M.B. Obtaining of Agr2 Specific Antibodies and Determination of the Agr2 Protein Distribution Pattern during Early Embryonic

Development and Tadpole Regeneration in *Xenopus laevis*. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2018, 49(6), 393–397. DOI: 10.1134/S1062360418060036.

36. Bayramov A.V., Ermakova G.V., Eroshkin F.M., Kucheryavyu A.V., **Martynova N.Y.**, Zraisky A.G. Presence of homeobox gene of Anf class in Pacific lamprey *Lethenteron camtschaticum* confirms the hypothesis about the importance of emergence of Anf genes for the origin of telencephalon in vertebrate evolution. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2017, 48(4), 241–251. DOI: 10.1134/S1062360417040026.

37. Bayramov A.V., Eroshkin F.M., Borodulin A.V., **Martynova N.Y.**, Ermakova G.V., Zraisky A.G. Secreted protein Noggin4 participates in the formation of forebrain structures in *Xenopus laevis* by inhibiting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2016, 47(4), 202–206. DOI: 10.1134/S1062360416040020.

38. Ерoшкин Ф.М., Байрамов А.В., Ермакова Г.В., Зарайский А.Г., **Мартынова Н.Ю.** Молекулярные механизмы пространственной и временной регуляции экспрессии гомеобоксного гена *Xanf1* в раннем развитии зачатка переднего мозга у шпорцевой лягушки. *Биоорганическая химия*. 2018, 44(3), 303–315. DOI: 10.7868/S0132342318030065

39. Иванова А.С., Короткова Д.Д., **Мартынова Н.Ю.**, Аверьянова О.В., Зарайский А.Г., Терёшина М.Б. Способы специфичного подавления работы генов *in vivo* при помощи морфолиновых и *vivo*-морфолиновых олигонуклеотидов. *Биоорганическая химия*. 2018, 44(3), 348–352. DOI: 10.7868/S0132342318030120

40. Ерoшкин Ф.М., **Мартынова Н.Ю.**, Байрамов А.В., Ермакова Г.В., Иванова А.С., Короткова Д.Д., Зарайский А.Г. Взаимодействие секретируемого фактора *Aggr2* с его потенциальными рецепторами из семейства трехпетельных белков. *Биоорганическая химия*. 2017, 43(3), 330–332. DOI: 10.7868/S0132342317030058

41. Орлов Е.Е., Нестеренко А.М., **Мартынова Н.Ю.**, Зарайский А.Г. Визуализация градиента сайтов связывания морфогенов в эмбрионе шпорцевой лягушки с помощью флуоресцентно меченного гепарин-связывающего мотива морфогена *Vmp4*. *Биоорганическая химия*. 2017, 43(3), 333–336. DOI: 10.1134/S1068162017030128.

42. Байрамов А.В., Ерoшкин Ф.М., **Мартынова Н.Ю.**, Орлов Е.Е., Бородулин А.В., Зарайский А.Г. Секретируемый белок *Noggin4* – активатор Wnt/PCP сигнального каскада. *Биоорганическая химия*. 2017, 43(2), 216–219. DOI: 10.7868/S0132342317020026

43. **Мартынова Н.Ю.**, Нестеренко А.М., Орлов Е.Е., Ерoшкин Ф.М., Бородулин А.В., Байрамов А.В., Зарайский А.Г. Взаимодействие секретируемых белков *Noggin4* и *Wnt8* из эмбрионов шпорцевой лягушки

*Xenopus laevis*. *Биоорганическая химия*. 2016, 42(4), 375–378. DOI: 10.7868/S0132342316030118.

44. Nesterenko A.M., Orlov E.E., Ermakova G.V., Ivanov I.A., Semenyuk P.I., Orlov V.N., **Martynova N.Y.**, Zaraisky A.G. Affinity of the heparin binding motif of Noggin1 to heparan sulfate and its visualization in the embryonic tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015, 468(1-2), 331–336. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.100.

45. Ерошкин Ф.М., Байрамов А.В., Аверьянова О.В., Соловьева Е.А., Серебрякова М.В., Зарайский А.Г., **Мартынова Н.Ю.** Получение секретируемых белков семейства Noggin и определение их биологической активности. *Биоорганическая химия*. 2013, 39(2), 191–196. DOI: 10.7868/S0132342313020048

46. Ерошкин Ф.М., Байрамов А.В., **Мартынова Н.Ю.**, Зарайский А.Г. Использование люциферазных репортерных конструкций для изучения способности белка Noggin2 ингибировать сигнальные каскады в эмбрионах шпорцевой лягушки. *Биоорганическая химия*. 2012, 38(3), 385–388. eLIBRARY ID: 17726707

47. Ermakova G.V., Kucheryavyu A.V., Eroshkin F.M., **Martynova N.Y.**, Zaraisky A.G., Bayramov A.V. Study of the Early Telencephalon Genes of Cyclostomes as a Way to Restoring the Evolutionary History of This Unique Part of the Central Nervous System of Vertebrates. *Paleontological Journal*. 2021, 55(7), 752–765. DOI: 10.1134/S0031030121070030.

48. Korotkova D.D., Lyubetsky V.A., Ivanova A.S., Rubanov L.I., Seliverstov A.V., Zverkov O.A., **Martynova N.Y.**, Nesterenko A.M., Tereshina M.B., Peshkin L., Zaraisky A.G. Bioinformatics Screening of Genes Specific for Well-Regenerating Vertebrates Reveals *c-answer*, a Regulator of Brain Development and Regeneration. *Cell Reports*. 2019, 29(4), 1027–1040.e6. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.09.038.

#### **Патенты:**

1. Байрамов А.В., Ерошкин Ф.М., **Мартынова Н.Ю.**, Ермакова Г.В., Серебрякова М.В., Соловьева Е.А., Зарайский А.Г. Способ блокирования сигнального пути, активируемого TGF-beta фактором Vg1 в клетках животных, Патент РФ N RU 2391352, 2010 г.
2. Байрамов А.В., Ерошкин Ф.М., **Мартынова Н.Ю.**, Ермакова Г.В., Серебрякова М.В., Соловьева Е.А., Зарайский А.Г. Способ блокирования сигнального пути, активируемого TGF-beta фактором Derriere в клетках животных, Патент РФ N RU 2407799, 2010 г.
3. Байрамов А.В., Ерошкин Ф.М., **Мартынова Н.Ю.**, Ермакова Г.В., Серебрякова М.В., Соловьева Е.А., Зарайский А.Г. Способ блокирования сигнального пути, активируемого фактором Wnt8 в клетках животных с помощью белков семейства Noggin Патент РФ N 2473561, 2011 г.