

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

На правах рукописи

Паршина Елена Анатольевна

**РОЛЬ ЗИКСИНА, БЕЛКА ФОКАЛЬНОЙ АДГЕЗИИ, В РЕГУЛЯЦИИ УРОВНЯ
ТРАНСКРИПТОВ ГЕНОВ-МАРКЕРОВ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Специальность – 1.5.3 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

*диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук*

Москва – 2022 г.

Работа выполнена в лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Мартынова Наталья Юрьевна, кандидат биологических наук.

Официальные оппоненты:

Шидловский Юлий Валерьевич, доктор биологических наук, профессор РАН, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов в развитии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук.

Лябин Дмитрий Николаевич, кандидат биологических наук, руководитель группы регуляции биосинтеза белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт белка Российской академии наук.

Ведущая организация:

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

Защита диссертации состоится 29 июня 2022 г. в 11:00 на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10 и на сайте ИБХ РАН (<http://www.ibch.ru>).

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Важнейшими процессами эмбрионального развития являются дифференцировка клеток и морфогенез. Формирование разных типов клеток и тканей – результат дифференциальной экспрессии генов, а правильному расположению клеток в эмбрионе способствуют морфогенетические движения. Благодаря синхронизации этих процессов эмбриональное развитие проходит нормально. Одной из актуальных проблем молекулярной биологии развития является выяснение механизмов, отвечающих за согласование процессов эмбрионального развития. В решении данной задачи может помочь поиск белков, способных, координировать морфогенетические движения клеток и регулировать экспрессию факторов плюрипотентности и дифференцировки.

На данный момент хорошо исследовано влияние дифференцировки клеток на их морфогенетические движения. Однако обратный процесс – влияние морфогенеза на клеточную дифференцировку – изучен недостаточно. Цитоскелетный белок *Zyxin*, способный регулировать генную экспрессию, – один из немногих известных белков-посредников, обеспечивающих такую связь.

Zyxin играет важную роль в регуляции миграции, адгезии, пролиферации и дифференцировки клеток. Основная молекулярная функция *Zyxin* - контроль сборки актиновых филаментов посредством взаимодействий с несколькими белками, участвующими в формировании клеточных контактов. Кроме того, *Zyxin* может перемещаться в ядро при определенных условиях и модулировать экспрессию генов. В частности, сообщалось, что *Zyxin* перемещается в ядро, когда к клетке прилагается внешнее механическое напряжение.

На основании структуры, репертуара партнеров и поведения, *Zyxin* можно рассматривать в качестве каркаса для мультимерной белковой машины, которая связывает актин-зависимые морфогенетические движения клеток с транскрипцией генов в ядре. Поэтому было особенно интересно изучить возможные функции *Zyxin* в регуляции экспрессии генов во время эмбриогенеза, когда связь морфогенетических движений с экспрессией генов чрезвычайно важна.

Кроме того, нарушение функционирования *Zyxin* приводит к развитию широкого спектра злокачественных новообразований. Поэтому исследование его роли в регуляции дифференцировки клеток может иметь большое значение для биомедицины.

Цель и задачи исследования

Целью нашей работы было определение роли цитоскелетного белка *Zyxin* в регуляции процессов клеточной дифференцировки в эмбриональном развитии шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*).

Основываясь на данных высокопроизводительного секвенирования транскриптомов, мы поставили следующие задачи:

- Подтвердить влияние *Zyxin* на гены плюрипотентности семейства *pou5f3* и проанализировать специфичность этого влияния.
- Определить механизм влияния *Zyxin* на количество транскриптов *pou5f3*.
- Осуществить поиск белков-партнеров *Zyxin*, обеспечивающих это влияние.
- Исследовать механизмы увеличения количества транскриптов других генов плюрипотентности (*klf4*, *vent2.1*, *vent2.2*).
- Проанализировать функциональную значимость обнаруженного механизма на других модельных объектах.

Научная новизна и практическая значимость работы

В этой работе мы впервые продемонстрировали, что цитоскелетный белок Zyxin регулирует уровни мРНК генов *pou5f3*, *klf4* и *vent2.1 / 2* в стволовых клетках у эмбрионов *Xenopus laevis*, а также уровни мРНК *NANOG*, *POU5F1 / OCT4* и *KLF4* в человеческих клетках HEK293 и эмбрионах *Danio rerio*. Мы установили, что Zyxin уменьшает концентрацию мРНК генов семейства *pou5f3* за счет образования комплекса с мРНК-связывающим белком Ybx1, который, находясь вне этого комплекса, стабилизирует мРНК *pou5f3*.

На основании этих данных мы создали модель регуляции стабильности мРНК *pou5f3* с помощью Zyxin. Согласно этой модели, можно предположить, что на ранних стадиях развития *Xenopus laevis*, когда количество этого белка сравнительно невелико, Zyxin не препятствует связыванию Ybx1 с мРНК *pou5f3*. Однако, когда его концентрация начинает увеличиваться после активации транскрипции собственного генома зародыша, Zyxin начинает более интенсивно связывать Ybx1, тем самым предотвращая взаимодействие этого белка с мРНК *pou5f3*, что стимулирует его деградацию. В то же время любое воздействие, которое снижает концентрацию Zyxin, увеличивает концентрацию Ybx1-связанной мРНК. Противоположный эффект должен наблюдаться при увеличении концентрации Ybx1, что и происходило в наших экспериментах.

Важно отметить, что способность Ybx1 связывать мРНК другого ключевого регулятора стволовых клеток, *NANOG*, была недавно показана на клетках млекопитающих. Учитывая тот факт, что в настоящей работе мы обнаружили увеличение концентраций мРНК *NANOG* в эмбрионах *Danio rerio* и клетках человека с нокдауном *ZYXIN*, в обоих этих случаях может работать тот же механизм, в котором *ZYXIN* вмешивается в образование комплекса мРНК *NANOG* / Ybx1 и, таким образом, регулирует стабильность мРНК *NANOG*.

Помимо значительного повышения уровней мРНК *pou5f3*, нокдаун *zyxin* у эмбрионов *Xenopus* вызывал меньшее, но статистически значимое увеличение концентраций мРНК трех других генов, связанных с плюрипотентным статусом эмбриональных стволовых клеток, а именно *klf4*, *vent2.1* и *vent2.2*. Полученные в этой работе данные о влиянии Pou5f3.3 на экспрессию *klf4*, *klf5*, *vent2.2* и *vent2.1* у *Xenopus laevis* являются дополнением к имеющимся в литературе данным о влиянии факторов POU5 на экспрессию гомологов этих генов у других организмов. Данные, полученные в настоящей работе, указывают на то, что Zyxin может играть роль общего регулятора плюрипотентности в эмбриональных клетках, который подавляет активность генов плюрипотентности, таких как *pou5f3*, *POU5F1*, *Klf4*, *NANOG*.

Поскольку белки Zyxin и Ybx1 являются онкомаркерами, изучение их взаимодействия может иметь большое значение для биомедицины.

Публикации и апробация работы

По теме работы опубликовано 8 статей в рецензируемых журналах из списка ВАК. Результаты работы были представлены на 6 конференциях.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературных данных, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список сокращений, список литературы. Работа иллюстрирована 37 рисунками и 5 таблицами. Список литературы содержит 144 цитированных источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Выявление генов, экспрессия которых изменяется в ответ на подавление трансляции *zyxin*

Чтобы идентифицировать гены, прямо или косвенно регулируемые *Zyxin*, мы сравнили транскриптомы нервных пластинок, вырезанных вместе с подлежащей мезодермой у эмбрионов *Xenopus laevis* дикого типа и эмбрионов с подавленной экспрессией *zyxin* на стадии средней нейрулы (рис. 1). Для получения эмбрионов с нокдауном *zyxin* мы микроинъекцировали в оба blastomeres на двухклеточной стадии морфолиновые олигонуклеотиды (МО) к зрелой мРНК *zyxin* в позиции +1 до +25, где за первые три нуклеотида принят стартовый кодон AUG. В результате, была обнаружена разница в экспрессии 198 генов.



Рис. 1. Схема эксперимента.

Эти дифференциально экспрессируемые гены были подвергнуты анализу Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG), который выявил множественные генетические пути, которые активируются или подавляются при нокдауне *zyxin*. Так подавление *zyxin* ингибирует сигнальные пути, ответственные за дифференцировку дорсальных осевых структур (в частности, сигнальные пути Notch и Shh) и пути, которые регулируют межклеточные взаимодействия (фокальная адгезия и пути взаимодействия ЕСМ-рецепторов). В то время как, пути передачи сигналов Wnt и TGF-beta, ответственные за дифференцировку эпидермиса и вентральной мезодермы, по-видимому, активировались (рис. 2).

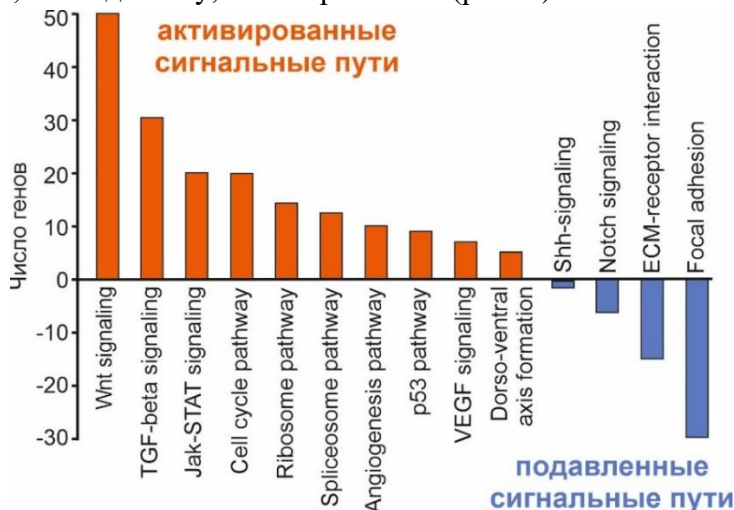


Рис. 2. Сигнальные пути, которые реагируют на нокдаун *zyxin*.

Результаты NGS были подтверждены не менее чем в трех независимых экспериментах с помощью анализа qRT-PCR для 36 выбранных генов, которые были наиболее чувствительны к нокдауну *zuxin* (рис. 3). В данном случае для получения эмбрионов с нокдауном *zuxin* мы микроинъектировали в оба бластомера на двухклеточной стадии *anti-zuxin* MO. В качестве контроля использовали контрольные MO с заменами в нуклеотидной последовательности. Зародыши инкубировали до стадии ранней нейрулы (стадия 13).

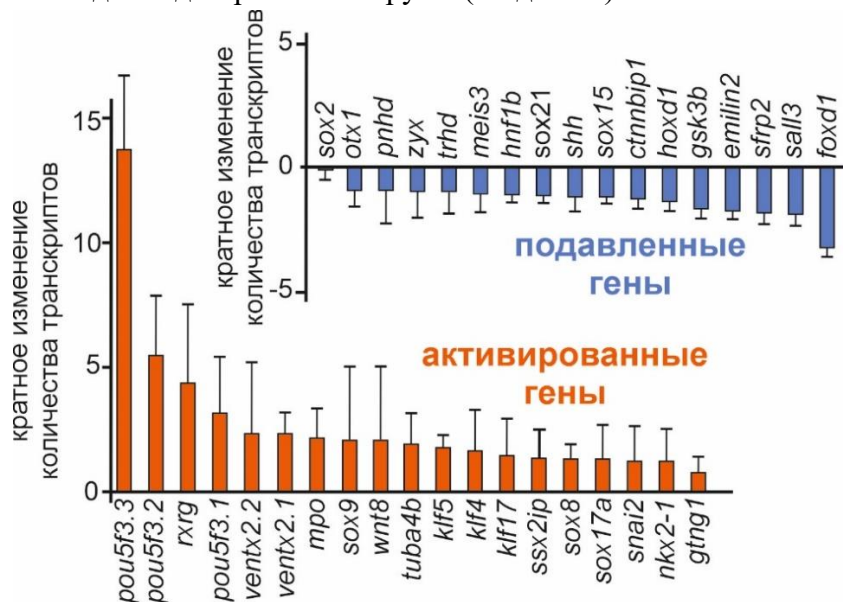


Рис. 3. Подтверждение данных NGS методом qRT-PCR. Данные представлены в виде кратного изменения экспрессии генов. Уровни транскрипции генов домашнего хозяйства *odc* и *efa* использовали для нормализации. Пределы погрешностей показывают стандартное отклонение.

Среди генов с повышенной экспрессией, были обнаружены гены следующих факторов плюрипотентности: *klf4*; гены семейства *rou5f3* (*rou5f3.3*, *rou5f3.2* и *rou5f3.1*), гомологи *POU5F1* млекопитающих; и *vent2.1/2*, функциональный гомолог *NANOG* млекопитающих. В то же время мы не наблюдали значительных изменений экспрессии некоторых генов, таких как *sall1* и *sall4*, которые, по данным литературы, поддерживают стволовой статус предшественников нервной пластинки.

Среди этих генов плюрипотентности гены семейства *rou5f3* продемонстрировали самую сильную реакцию на подавление активности *zuxin*. Поэтому в дальнейшей работе мы исследовали механизм усиления экспрессии этих генов у эмбрионов с нокдауном *zuxin*.

Чтобы подтвердить влияние ингибирования *zuxin* на концентрацию мРНК *rou5f3.3*, экспрессия которого изменялась наиболее сильно, мы исследовали уровни мРНК этого гена способом гибридизации *in situ*. Для этого мы инъектировали *anti-zuxin* MO в правые дорсальные бластомеры эмбрионов на 4-клеточной стадии и инкубировали эмбрионы до желаемой стадии. Левая сторона без инъекции использовалась в качестве внутреннего контроля. Метод гибридизации *in situ* также показал, что в области подавления трансляции *zuxin* уровень мРНК *rou5f3.3* выше, чем в соседних областях с нормальной экспрессией *zuxin* и в областях после инъекции контрольных MO (рис. 4). Уровень мРНК *rou5f3.3* при нокдауне *zuxin* оставался высоким до стадии ранней нейрулы (стадия 13). На более поздних стадиях разница в количестве транскриптов *rou5f3.3* была не так ярко выражена: на стадии средней нейрулы (стадия 16) в области инъекции *anti-zuxin* MO наблюдалось лишь небольшое превышение уровня мРНК *rou5f3.3*, на стадии глазных пузырей (стадия 22) разницы в экспрессии мРНК

rou5f3.3 после инъекции *anti-zuxin* МО по сравнению с контрольными МО не было. Однако, в области зародыша с подавленной трансляцией *zuxin* наблюдалось нарушение развития нервной трубки – она была расширена и не соответствовала стадии развития эмбриона.

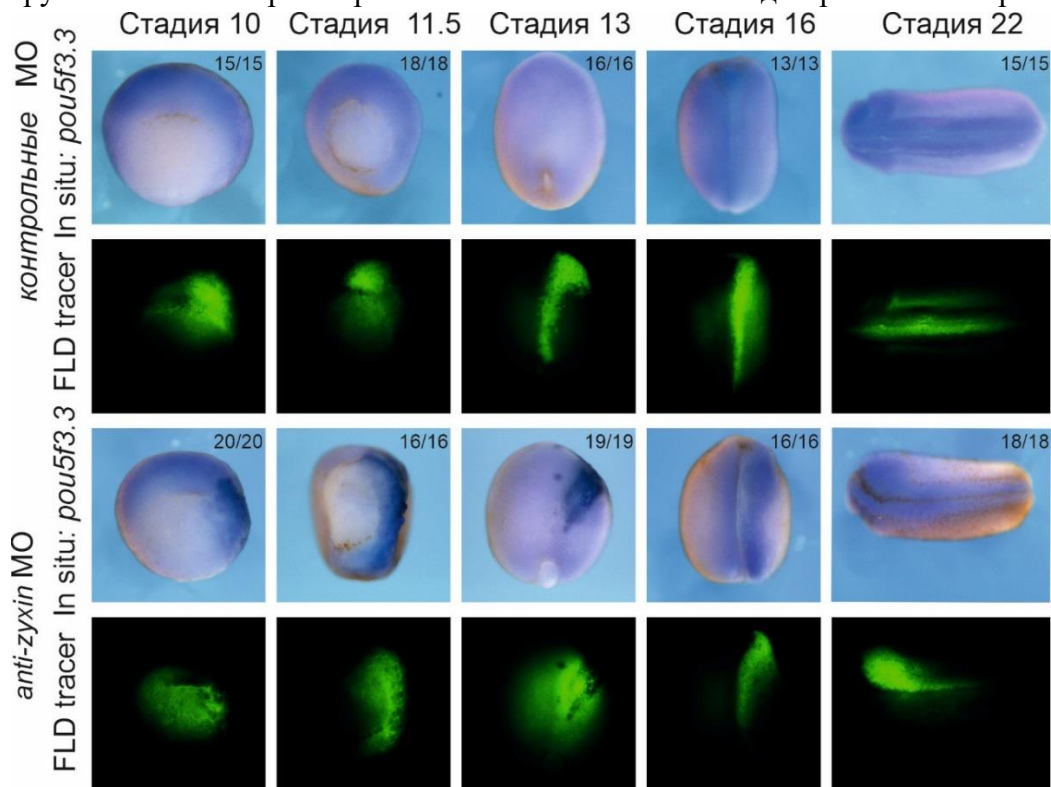


Рис. 4. Гибридизация *in situ* на мРНК *rou5f3.3* после инъекции МО. Локальное усиление экспрессии гена *rou5f3.3* в половинках эмбриона при нокадауне *zuxin* начинается на стадии гаструлы (стадия 11) и увеличивается во время нейруляции. Доля эмбрионов, показывающих проиллюстрированный паттерн экспрессии среди всего исследованных эмбрионов указана в правом верхнем углу. Визуализация места инъекции при помощи флуоресцентного трейсера FLD.

Мы предположили, что оверэкспрессия *zuxin* приведёт к снижению количества транскриптов генов семейства *rou5f3*. Действительно после микроинъекции экзогенной мРНК *zuxin* мы наблюдали снижение уровней РНК *rou5f3* у эмбрионов (рис. 5).

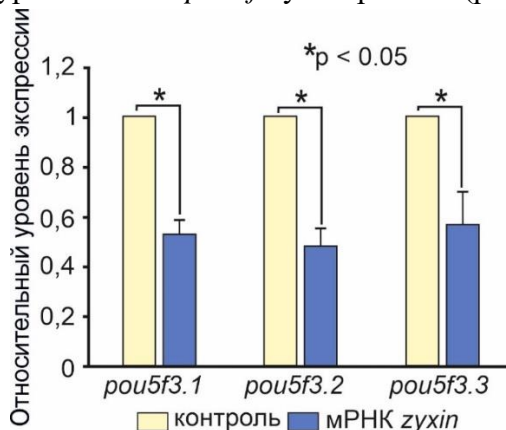


Рис. 5. Оверэкспрессия *zuxin* способствует снижению уровней транскриптов семейства *rou5f3.1-3* на стадии средней гаструлы. Микроинъекция 100 нг / мкл мРНК *zuxin* в каждый бластомер на двухклеточной стадии приводит к снижению количества транскриптов генов семейства *rou5f3* на 11 стадии. * - $p < 0,05$ по критерию Стьюдента.

Поскольку, нокдаун *zuxin* в эмбрионах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* приводил к увеличению количества транскриптов фактора плюрипотентности *pou5f3.3*, а также исходя из фенотипа этих эмбрионов, мы предположили, что подавление трансляции *zuxin* также будет оказывать влияние на экспрессию белка Pou5f3.3. Мы получили специфические поликлональные антитела к фрагменту Pou5f3.3 *Xenopus laevis*, содержащему аминокислотные остатки 125–136 (WHYPSWQQGNLK). Это позволило исследовать экспрессию на уровне эндогенного белка. У эмбрионов с нокдауном *Zuxin* наблюдалось значительное увеличение уровней эндогенного Pou5f3.3 по сравнению с контрольными эмбрионами (рис. 6). Этот результат подтверждает, что выявленное повышение количества мРНК *pou5f3.3* у этих эмбрионов действительно привело к увеличению количества белка.

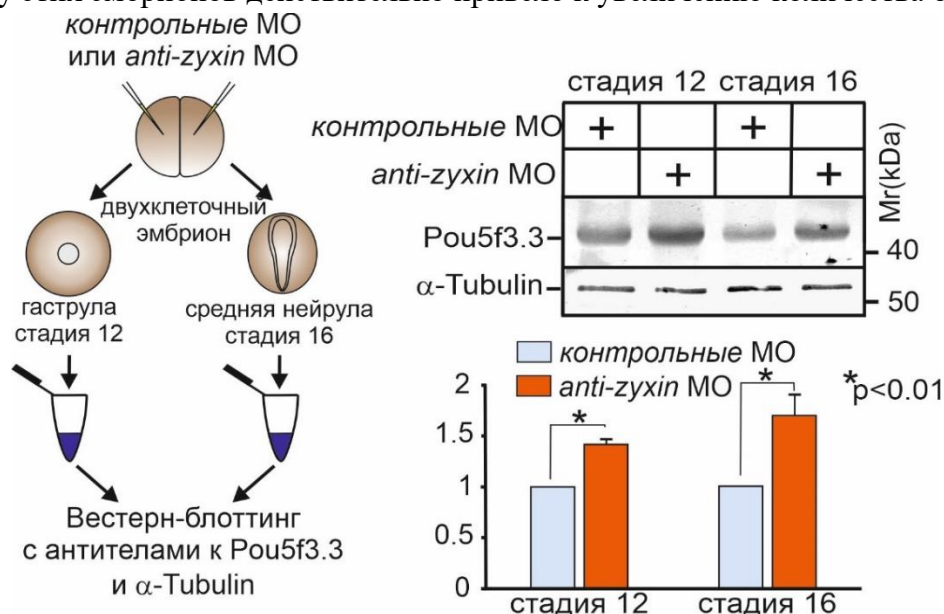


Рис. 6. Нокдаун *zuxin* приводит к увеличению количества эндогенного белка Pou5f3.3. Слева: схема эксперимента. Справа: вестерн-блоттинг с антителами к Pou5f3.3. Ниже справа: статистический анализ данных. * $p < 0,01$ по критерию Стьюдента.

Чтобы проверить физиологическое значение выявленных молекулярных эффектов *Zuxin* на экспрессию *pou5f3*, мы изучили эффекты подавления его экспрессии на дифференцировку клеток на модели эксплантатов анимальных шапочек (АШ) эмбрионов *Xenopus laevis* на стадии поздней бластулы, обработанных активинном А. Согласно работам других авторов оверэкспрессия белков семейства Pou5f3 в эксплантатах АШ подавляет дифференцировку мезодермы, которая обычно индуцируется активинном А. Мы выяснили, что нокдаун *zuxin* вызывает аналогичные эффекты. Эксплантаты АШ зародышей с нокдауном *zuxin* не вытягивались в ответ на добавление в среду активина А, то же происходило с эксплантатами с оверэкспрессией *pou5f3.3* (рис. 7).

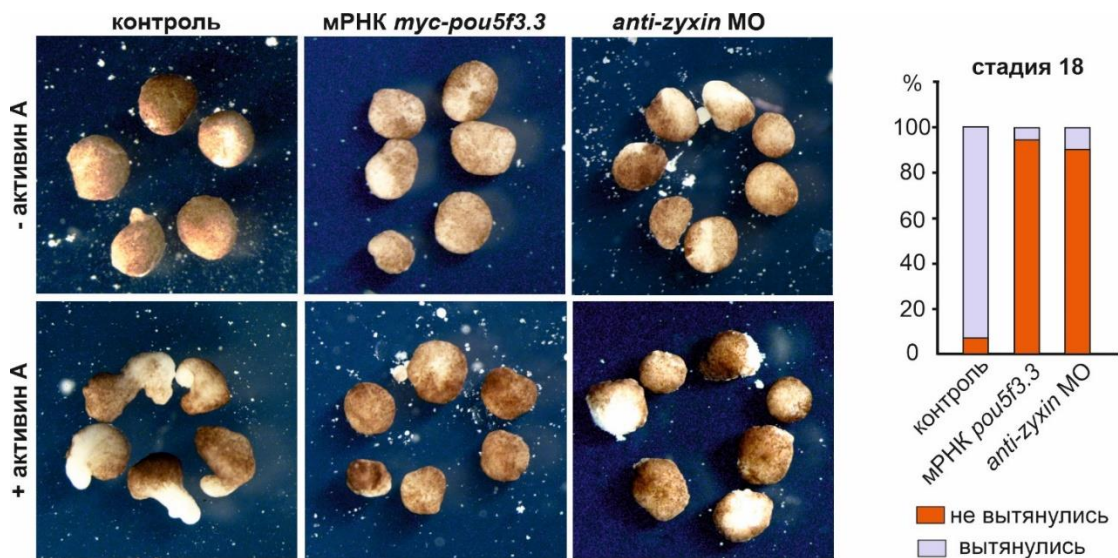


Рис. 7. Zyxin влияет на дифференцировку эмбриональных клеток. Слева: *anti-zyxin MO* ингибируют активность активина А в животных шапочках: шапочки, обработанные активином А (10 нг / мл), вытягиваются на стадии 18. Шапочки, инъекцированные мРНК *тус-rou5f3.3* (100 нг / мкл) или 0,3 мМ *anti-zyxin MO* не вытягиваются после обработки активином А на той же стадии. Справа: расчет процента удлинённых шапочек у животных после инъекции *anti-zyxin MO* или мРНК *тус-rou5f3.3* в трех независимых экспериментах.

Кроме того, по сравнению с контрольными эксплантатами АШ, обработанными активином А, экспрессия маркеров дифференцировки мезодермы была значительно подавлена в эксплантатах АШ зародышей с нокадауном *zyxin* (рис. 8).

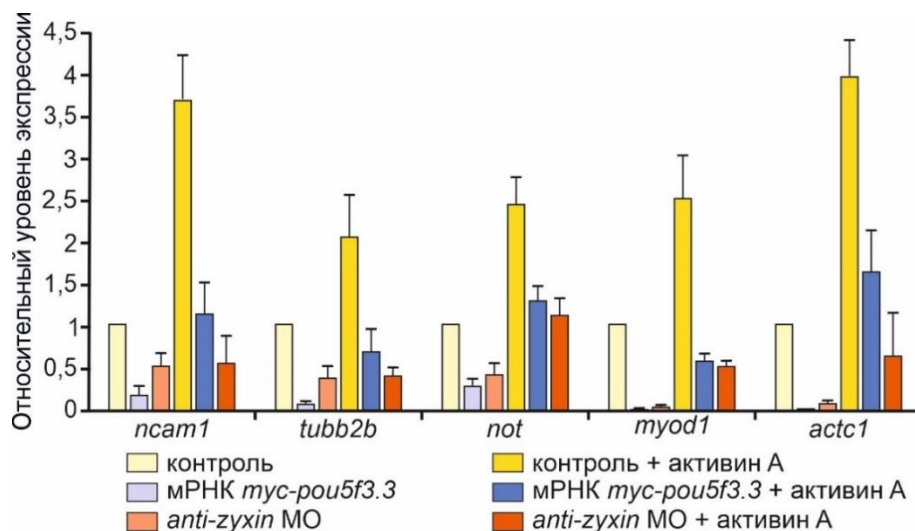


Рис. 8. Согласно результатам qRT-PCR, *anti-zyxin MO* блокируют дифференцировку тканей, индуцированную активином А, аналогично мРНК *тус-rou5f3.3*. Изменение активности активина А определялось по экспрессии генов, регулирующих клеточную адгезию и модулирование цитоскелета *ncam1* (neural cell adhesion 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).

2. Повышение уровня мРНК *rou5f3.3* происходит вследствие замедления деградации материнских транскриптов, а не из-за активации транскрипции

Чтобы определить, как *Zuxin* регулирует уровни мРНК *rou5f3.3*, мы сначала проверили, может ли *Zuxin* влиять на транскрипцию этого гена. Чтобы проверить данную гипотезу мы создали репортерную конструкцию на основе вектора *pNL1.1[Nluc]*. В сайт множественного клонирования, находящийся в данной плазмиде перед геном люциферазы, была клонирован фрагмент (- 2523 п.н. – 0 п.н.) 5'-некодирующей области *rou5f3.3* (рис. 9), который по данным литературы отвечает за транскрипцию *rou5f3.3* во время оогенеза.

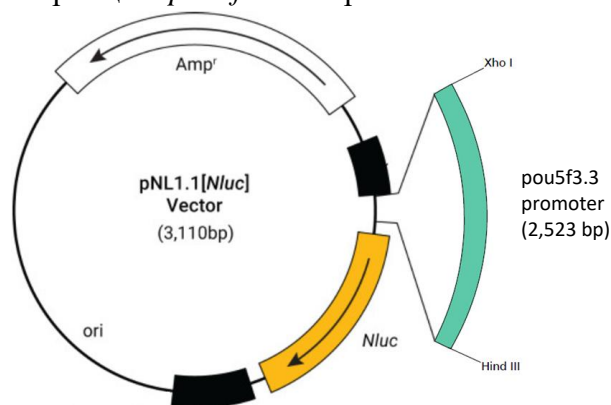


Рис. 9. Репортерная конструкция *pNL1.1-rou5f3.3* с геном люциферазы под контролем участка (- 2523 п.н. – 0 п.н.) промотора гена *rou5f3.3*.

Полученную конструкцию *pNL1.1-rou5f3.3* мы микроинъецировали в эмбрионы *Xenopus laevis* на двухклеточной стадии вместе с контрольным репортером *Renilla* либо с *anti-zuxin* МО, либо с контрольными МО.

В результате мы не наблюдали значимых различий в экспрессии репортерного гена люциферазы под контролем участка промоторной области *rou5f3.3* - 2523 п.н. при инъекции *anti-zuxin* МО и контрольных МО (рис. 10).

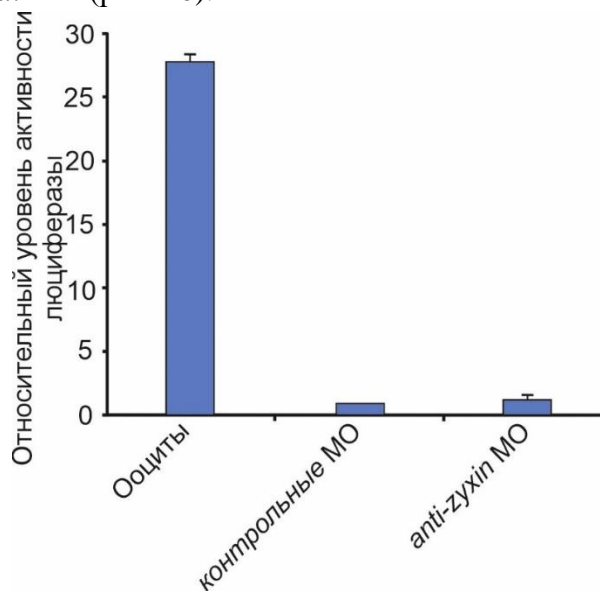


Рис. 10. Изучение активности промотора *rou5f3.3*. Нокдаун *zuxin* не влияет на активность фрагмента промотора (-2523-0 п.н.) *rou5f3.3*, ответственного за его экспрессию во время оогенеза (промотор активен только в ооцитах).

Хотя этот эксперимент дает некоторые указания на то, что *Zuxin* не регулирует транскрипцию *rou5f3.3*, мы не могли исключить того, что некоторые цис-элементы, которые регулируются *Zuxin*, могут находиться вне исследуемого фрагмента промотора *rou5f3.3*.

Поскольку этот ген является материнским, т.е. его транскрипты накапливаются во время оогенеза, мы проверили, может ли такое же повышение уровня мРНК *rou5f3.3* происходить у эмбрионов с нокдауном *zuxin* в условиях полного ингибирования транскрипции актиномицином D.

Для этого мы вводили актиномицин D (0,2 мМ) в полость бластоцеля эмбрионов *Xenopus* на стадии бластулы (стадия 7), предварительно инъецированных либо *anti-zuxin* МО, либо контрольными МО. Поскольку мРНК *rou5f3.3* является материнским транскриптом, такая обработка должна исключить вклад транскрипции в любые изменения накопленного уровня этой мРНК у эмбрионов. Эффективность опосредованного актиномицином D ингибирования транскрипции подтверждается сильным снижением уровней мРНК генов *sox2*, *foxd1* и *rou5f3.1*, транскрипция которых начинается после активации эмбрионального генома. Напротив, уровни мРНК *rou5f3.3* в обработанных эмбрионах были значительно выше, чем у контрольных эмбрионов (рис. 11). Другими словами, даже в условиях ингибирования транскрипции мы наблюдали увеличение количества транскриптов *rou5f3.3* в зародышах с нокдауном *zuxin*. Таким образом, мы пришли к выводу, что *Zuxin* регулирует уровни мРНК *rou5f3.3* через контроль ее стабильности, а не за счет активации транскрипции.

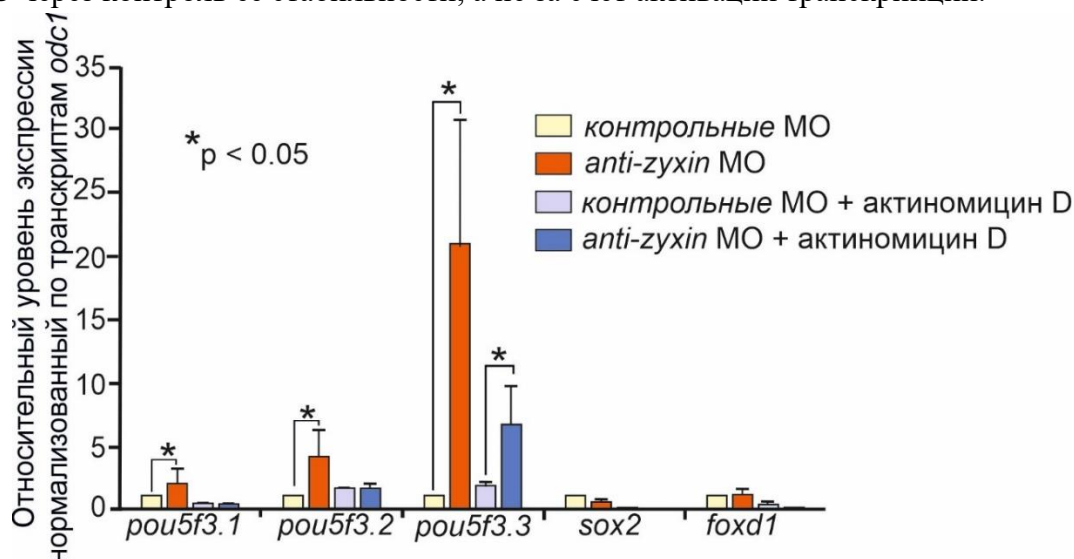


Рис. 11. Влияние нокдауна *zuxin* на материнский ген *rou5f3.3* и зиготические гены *sox2*, *foxd1*, *rou5f3.2* и *rou5f3.1* в условиях транскрипционной блокады актиномицином D. Разница в уровне мРНК *rou5f3.3* в контрольных эмбрионах и при подавлении трансляции *zuxin* сохраняется в условиях блокирования транскрипции. Уровень транскрипции гена домашнего хозяйства *odc* использовали для нормализации. Планки погрешностей указывают на стандартные отклонения, полученные в трех независимых экспериментах. * - $p < 0,05$ по критерию Стьюдента.

3. *Zuxin* препятствует образованию комплексов между мРНК *rou5f3* и белком *Ybx1*

Затем мы попытались понять механизм, с помощью которого *Zuxin* контролирует стабильность мРНК *rou5f3.3*. Ранее в нашей лаборатории при целенаправленном поиске партнеров *Zuxin* в системе двугибридного дрожжевого скрининга был обнаружен белок *Ybx1*. Этот белок является Y-бок транскрипционным фактором, который может образовывать рибонуклеопротеиновый (РНП) комплекс с мРНК, тем самым значительно повышая устойчивость транскриптов к деградации. Учитывая это, мы предположили, что *Ybx1* может играть важную роль в молекулярном механизме, с помощью которого *Zuxin* регулирует

стабильность мРНК *rou5f3.3* и, вероятно, двух других генов семейства *rou5f3*: *rou5f3.1* и *rou5f3.2*.

Чтобы проверить эту гипотезу, мы сначала подтвердили, что Zyxin может взаимодействовать с Ybx1. В дрожжевой двугибридной системе было обнаружено взаимодействие между LIM-доменами Zyxin и С-концевым доменом Ybx1 (рис. 12).

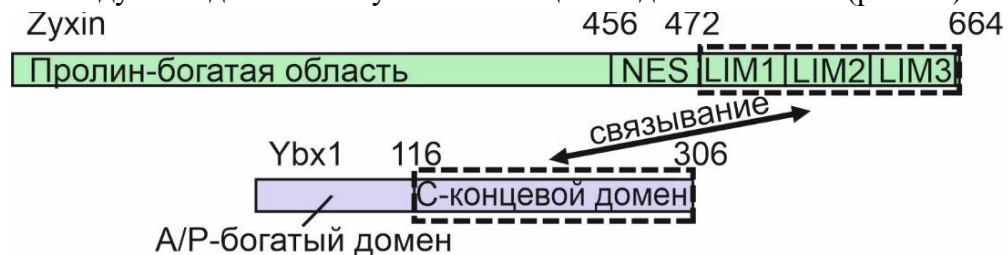


Рис. 12. Схема взаимодействия белков Zyxin и Ybx1. Стрелкой показаны белковые домены, взаимодействие которых было обнаружено в системе двугибридного дрожжевого скрининга.

В настоящей работе мы исследовали специфичность взаимодействия Zyxin и Ybx1 методом ко-иммунопреципитации. Для этого эксперимента двухклеточные эмбрионы были инъецированы смесью синтетических мРНК flag-тагированным LIM домен-содержащим С-концевым (455-664 а.к.) фрагментом Zyxin и Мус-тагированными полноразмерным Ybx1, N-(1-115 а.к) и С-концевыми доменами Ybx1 (116-306 а.к) в концентрации 100 нг/мкл. Формирование комплекса между LIM-доменной областью Zyxin и С-концевым доменом Ybx1 анализировали при помощи anti-flag антител. Как видно на рис. 13 Zyxin и Ybx1 формируют комплекс, взаимодействуя своими С-концевыми участками. Взаимодействие между N-концевым доменом Ybx1 и LIM доменами Zyxin (рис. 13) не было обнаружено.

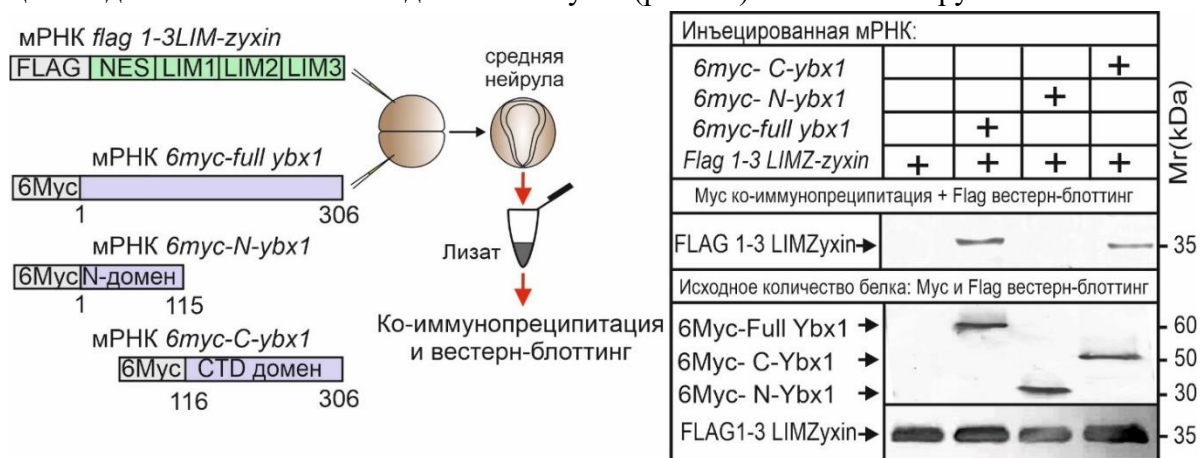


Рис. 13. Ко-иммунопреципитационный анализ связывания LIM-доменов Zyxin с полноразмерным белком Ybx1 и его СТД-доменом в экстрактах эмбрионов *Xenopus*, инъецированных соответствующими мРНК. Слева: схема эксперимента. Справа: результаты ко-иммунопреципитации.

Важно отметить, что эти результаты согласуются с тем фактом, что только LIM-домены Zyxin были способны восстанавливать уровни мРНК *rou5f3* у эмбрионов с нокдауном *zyxin*, в то время как N-концевой домен этого не делал (рис. 14). В этом случае подавление трансляции осуществляли путем микроинъекций *anti-zyxin* splice MO на участок 5588-5613 п.н. (экзон 3, интрон 3) непротранскрибированной мРНК *zyxin*. Для восстановления нормального уровня белка вместе с MO на стадии двух бластомеров микроинъекцировали синтетическую зрелую мРНК *zyxin* или мРНК его N- и С-частей.

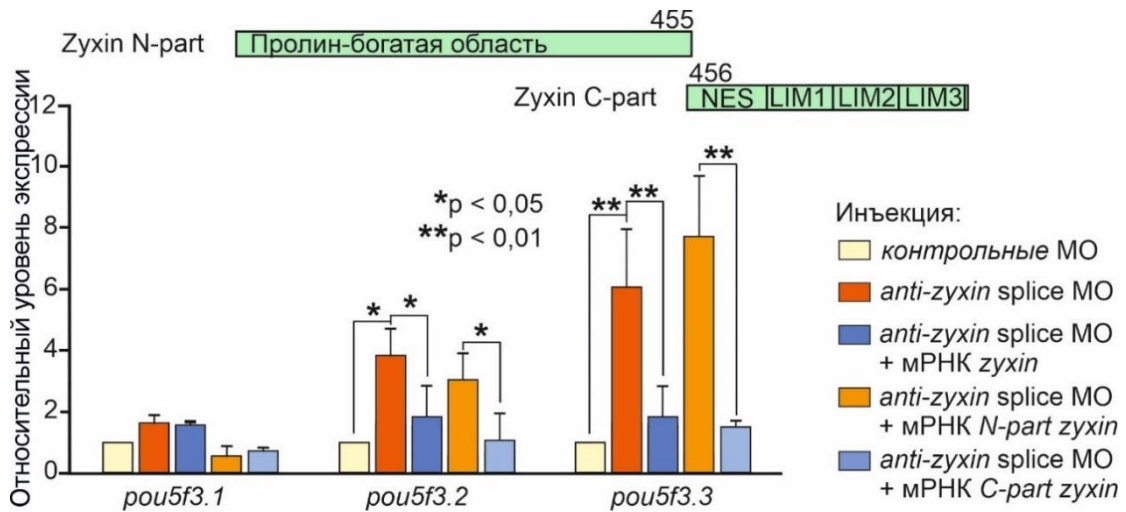


Рис. 14. Только полноразмерный Zyxin и его С-концевой участок восстанавливают нормальный уровень мРНК генов *rou5f3.2* и *rou5f3.3* при ко-инъекции их мРНК с *anti-zyxin splice* МО. Планки погрешностей указывают на стандартные отклонения, полученные в трех независимых экспериментах. * - $p < 0,05$ и ** - $p < 0,01$ по критерию Стьюдента.

Кроме того, мы продемонстрировали с помощью анализа методом pull-down, что взаимодействие Zyxin и Ybx1 происходит через 2-й LIM-домен Zyxin и С-концевой домен Ybx1 (рис. 15).

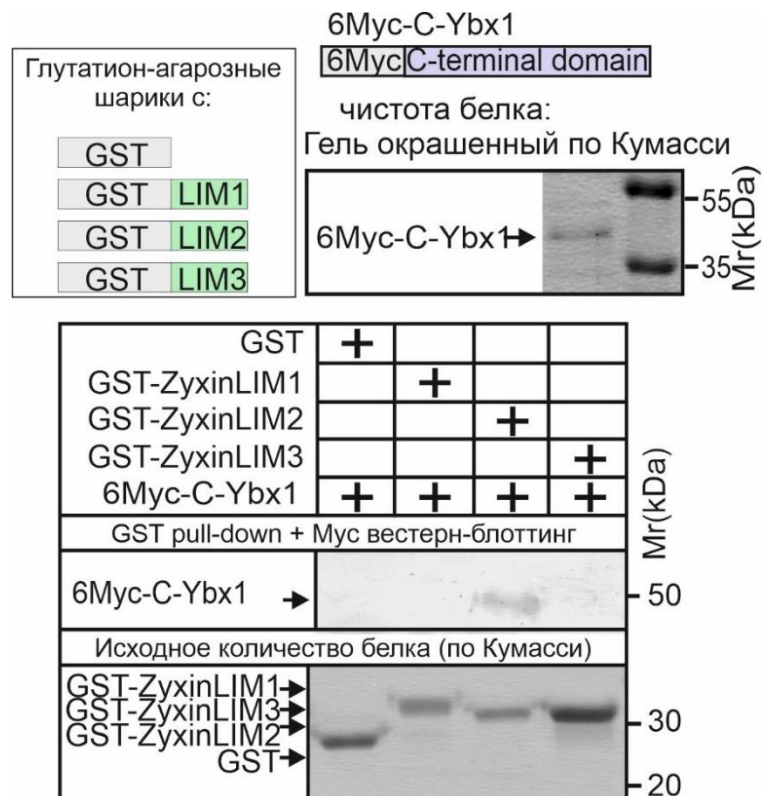


Рис. 15. *In vitro* pull-down анализ взаимодействия 6Myc-C-Ybx1 и отдельных LIM-доменов Zyxin. Вверху: схема белковых конструкторов, которые были использованы в эксперименте. Чистота 6Myc-C-Ybx1, транслированного в эмбрионах *Xenopus laevis* и очищенного из лизатов, показана на геле окрашенном по Кумасси.

Поскольку Ybx1 может перемещаться между клеточным ядром и цитоплазмой, а Zuxin в основном ко-локализуется с актиновым цитоскелетом и в области клеточных контактов, было интересно посмотреть, может ли Zuxin влиять на распределение Ybx1 между ядром и цитоплазмой. Для этого мы разделили ядерную и цитоплазматическую фракции от эмбрионов, которым инъецировали либо смесь мРНК *бмус-ybx1* и *zuxin*, либо только мРНК *бмус-ybx1*. Дальнейший анализ распределения Мус-Ybx1 с помощью вестерн-блоттинга показал, что добавление Zuxin снижает концентрацию Ybx1 в ядре, но увеличивает его концентрацию в цитоплазме (рис. 16). Таким образом, Zuxin может взаимодействовать с Ybx1, удерживая его в цитоплазме.

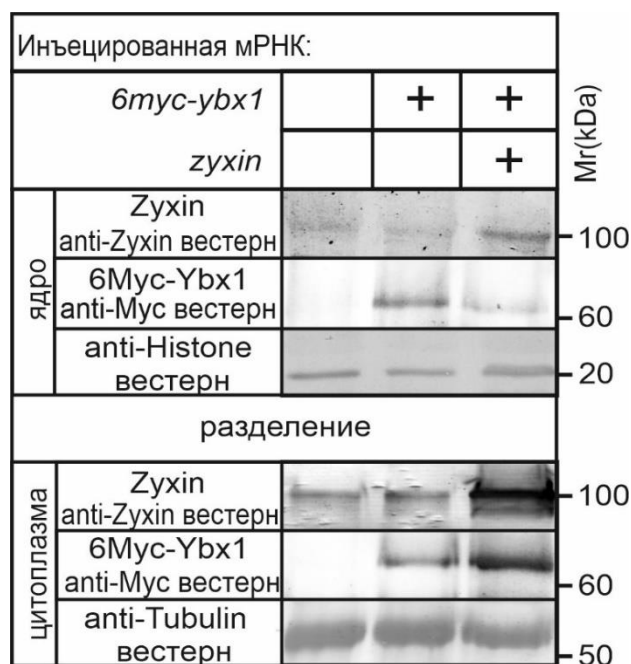


Рис. 16. Анализ распределения белков Zuxin и Ybx1 между ядерной и цитоплазматической фракциями. Zuxin снижал уровень бМус-Ybx1 в ядре и повышал уровень бМус-Ybx1 в цитоплазме.

Затем мы использовали РНК-иммунопреципитационный анализ (RIP), чтобы проверить, способен ли Ybx1 образовывать комплексы с мРНК *rou5f3* и может ли Zuxin препятствовать образованию этих комплексов. Для этого в эмбрионы на стадии двух бластомеров микроинъецировали либо мРНК *бмус-ybx1*, либо мРНК *zuxin*. Эмбрионы лизировали на стадии гастрюлы (стадия 11), и сравнивали количество соосажденных на анти-Мус-агарозе мРНК *rou3f3.1*, *rou5f3.2* и *rou5f3.3* после ко-IP с помощью qRT-ПЦР. Мы наблюдали гораздо более высокое обогащение мРНК *rou3f3.1*, *rou5f3.2* и *rou5f3.3* в образцах с коэкспрессированным бМус-Ybx1, чем в контрольных образцах, в которых коэкспрессировался бМус-Chordin (рис. 17). Напротив, значительное снижение уровней мРНК *rou5f3.1*, *rou5f3.2* и *rou5f3.3* наблюдалось в образцах, в которых бМус-Ybx1 коэкспрессировался с Zuxin. Таким образом, мы пришли к выводу, что Ybx1 действительно может формировать комплекс с мРНК *rou5f3* и что Zuxin может препятствовать образованию этого комплекса (рис. 17).

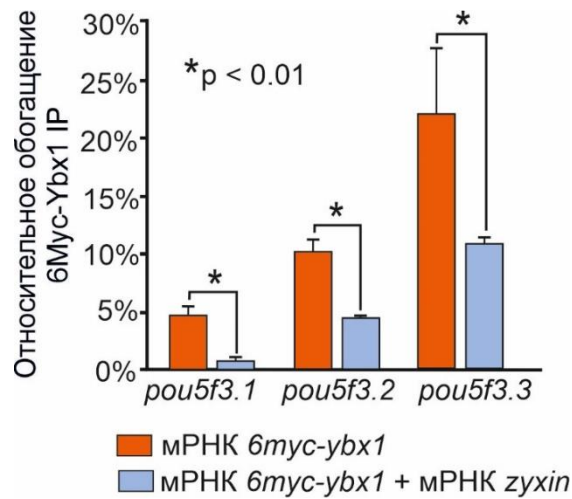


Рис. 17. Данные RIP указывают на способность Ybx1 связывать мРНК rou5f3.1-3. Zyxin уменьшает эту способность.

4. Оверэкспрессия ybx1 и задержка Zyxin в клеточном ядре увеличивает уровни мРНК rou5f3

Для последующего изучения эффектов Ybx1 на стабильность мРНК rou5f3 мы проверили, может ли оверэкспрессия или нокдаун ybx1 изменять уровни этих эндогенных мРНК у эмбрионов.

Мы микроинъекцировали синтезированную *in vitro* мРНК ybx1 в концентрации 50 нг/мкл в оба бластомера на двухклеточной стадии. В качестве контроля использовали зародышей *Xenopus laevis* без инъекции. Зародыши инкубировали до стадии ранней нейрулы, как в экспериментах с подавлением трансляции Zyxin.

Как и в случае нокдауна Zyxin, по сравнению с контрольными эмбрионами, оверэкспрессия Ybx1 в эмбрионах *Xenopus laevis* значительно увеличивала уровни мРНК всех трех генов rou5f3 на стадии ранней нейрулы. Противоположный эффект наблюдался, когда трансляция эндогенной мРНК ybx1 блокировалась инъекцией anti-ybx1 МО (рис. 18).

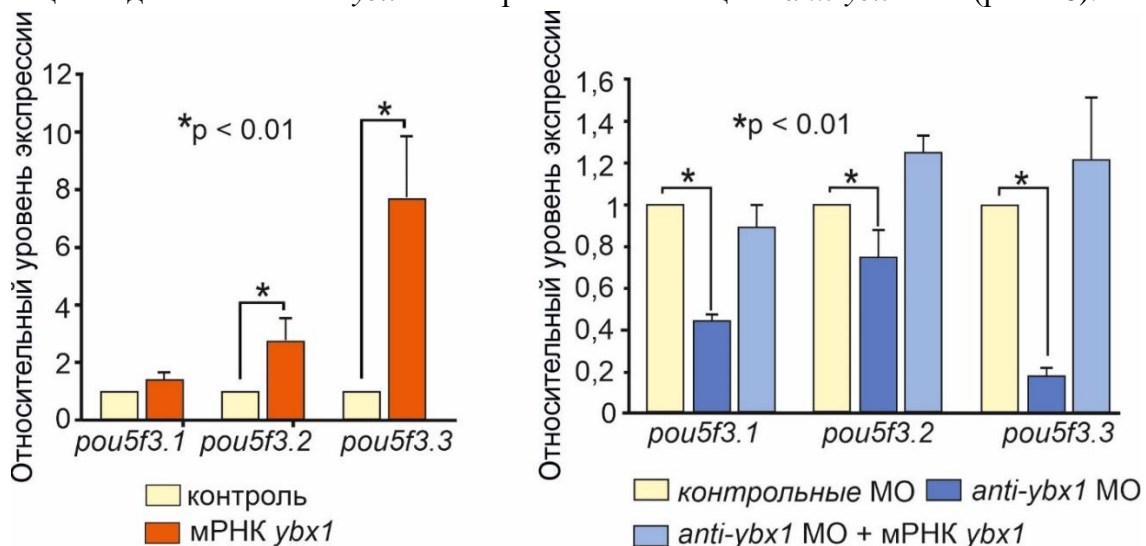


Рис. 18. Оверэкспрессия ybx1 способствует увеличению уровней транскриптов генов семейства rou5f3. Подавление трансляции мРНК ybx1 снижает уровни мРНК rou5f3. Восстановление нормального уровня мРНК этих генов происходит в результате восстановления нормальной экспрессии ybx1.

Чтобы подтвердить влияние изменений экспрессии ybx1 на экспрессию гена rou5f3.3 с помощью другого метода, мы проанализировали уровни его транскриптов у эмбрионов с

оверэкспрессией *ybx1* путем гибридизации *in situ*. Действительно, локальная инъекция мРНК *ybx1* в правые дорсальные бластомеры эмбрионов на 4-клеточной стадии (левая неинъецированная сторона при этом служила контролем) увеличивала уровни мРНК *rou5f3.3*, как при инъекции *anti-zuxin* МО (рис. 19 с рис. 4). Однако эффект от оверэкспрессии *ybx1* сохранялся до более поздних стадий развития. Таким образом, различия в уровнях мРНК *rou5f3.3* четко наблюдались даже на стадии хвостовой почки (стадия 22) (рис. 19).

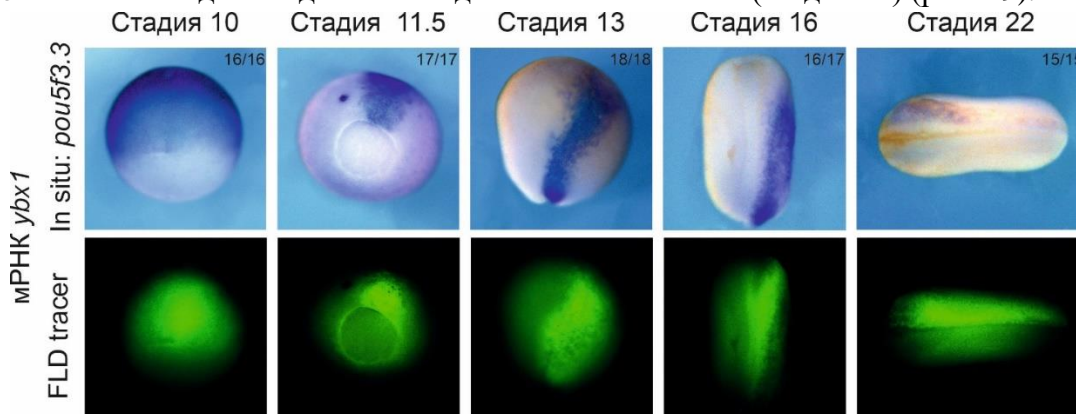


Рис. 19. Гибридизация *in situ* на мРНК *rou5f3.3* после инъекции мРНК *ybx-1* показала, что оверэкспрессия *ybx1* увеличивает уровни мРНК *rou5f3.3*, что аналогично эффектам инъекции *anti-zuxin* МО. Доля эмбрионов, показывающих проиллюстрированный паттерн экспрессии среди всего исследованных эмбрионов указана в правом верхнем углу. Визуализация места инъекции при помощи флуоресцентного трейсера FLD.

Поскольку Ybx1 - многофункциональный белок, способный не только регулировать деградацию мРНК, но и активировать транскрипцию некоторых генов, мы провели анализ активности промоторной области (-2523-0) *rou5f3.3* при оверэкспрессии Ybx1. Мы не наблюдали каких-либо различий в активности промотора *rou5f3.3* у эмбрионов, оверэкспрессирующих Ybx1, по сравнению с контрольными эмбрионами, что указывает на то, что Ybx1 не может влиять на транскрипцию *rou5f3.3*, но, по-видимому, регулирует только стабильность его мРНК (рис. 20).

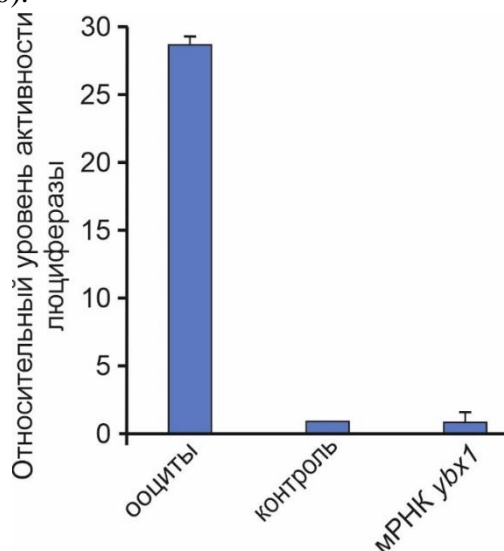


Рис. 20. Изучение активности промотора *rou5f3.3*. Оверэкспрессия *ybx1* не влияет на активность фрагмента промотора (-2523-0 п.н.) *rou5f3.3*.

Наконец, чтобы проверить влияние истощения цитоплазматического Zuxin на уровни мРНК *rou5f3*, мы поставили эксперимент, в котором количество Zuxin в цитоплазме

уменьшалось за счет его накопления в клеточных ядрах. Для этого мы обработали эмбрионы лептомицином В, специфическим ингибитором белка CRM1, который ингибирует ядерный экспорт Zuxin. Логика этого эксперимента заключалась в том, что если взаимодействие между Zuxin и Ybx1 происходит в цитоплазме, обработка эмбрионов лептомицином В должна снижать концентрации Zuxin в цитоплазме, повышать уровни свободного Ybx1 и, таким образом, увеличивать количество транскриптов *rou5f3*. Действительно, как и в случае нокдауна Zuxin *anti-zuxin* MO, мы наблюдали увеличение концентраций мРНК всех трех генов *rou5f3* у эмбрионов, обработанных лептомицином В (рис. 21).

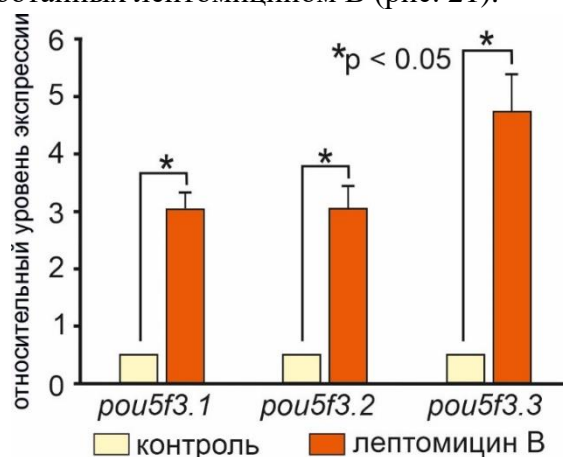


Рис. 21. Инкубация зародышей *Xenopus laevis* в 0.1 мкг/мл лептомицина В до стадии гаструлы увеличивает количество транскриптов генов семейства *rou5f3*.

5. Увеличение количества мРНК других генов плюрипотентности может происходить за счет связывания с Ybx1 или вследствие оверэкспрессии фактора *rou5f3.3*

Поскольку в результате нокдауна Zuxin мы наблюдали увеличение количества транскриптов не только генов семейства *rou5f3*, но и других генов, продукты которых регулируют плюрипотентный статус клеток, было интересно исследовать возможные механизмы, которые приводят к увеличению количества мРНК этих генов.

В первую очередь, мы проверили гипотезу об участии белка Ybx1 в этом процессе. Этот белок связывает мРНК многих генов, в том числе, как показано в этой работе, генов семейства *rou5f3*, а также, по данным литературы, мРНК другого ключевого регулятора плюрипотентности *NANOG* в клетках млекопитающих. Вполне вероятно то, что он способен связывать мРНК других генов-регуляторов плюрипотентности *klf4*, *sox2*, *vent2.1* и *vent2.2*. Мы провели РНК-иммунопреципитационный анализ (RIP), как описано выше при исследовании связывания Ybx1 с мРНК *rou5f3*, также проверили может ли Zuxin влиять на образование этих комплексов.

Оказалось, что полноразмерный бтус-Ybx1 образует комплексы с мРНК *vent2.1*, *vent2.2* и *sox2*, но не связывает мРНК *klf4*. Интересно, что коэкспрессия бтус-Ybx1 и Zuxin по-разному влияет на стабильность комплексов с РНК: если в случае с мРНК генов семейства *rou5f3*, Zuxin дестабилизировал взаимодействие, то для мРНК *sox2*, *vent2.1* и *vent2.2* мы наблюдали обратный эффект – добавление Zuxin стабилизировало связывание (рис. 22)

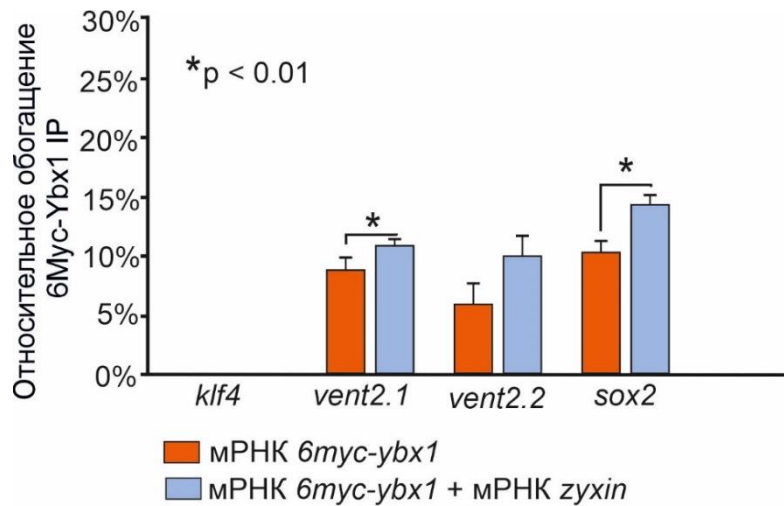


Рис. 22. RIP мРНК генов плюрипотентности с белком Ybx1.

Основываясь на полученных данных, можно утверждать, что увеличение количества транскриптов *klf4* при нокдауне *zyxin* не за счет образования комплекса с белком Ybx1. Также если учитывать, что Zyxin стабилизирует комплекс Ybx1 с мРНК *vent2.1* и *vent2.2*, маловероятным кажется вклад Ybx1 в увеличение количества их транскриптов при нокдауне *zyxin*.

Исходя из данных о том, что *rou5f3.3* транскрибируется только в оогенезе, а его белковый продукт поддерживает недифференцированное состояние клеток, очевидно, что деградация мРНК и соответственно уменьшение количества белка Rou5f3.3, необходимо для нормального протекания процессов дифференцировки и эмбрионального развития.

Чтобы оценить важность деградации мРНК *rou5f3.3* для дальнейшего развития мы сверхэкспрессировали Мус-тагированный Rou5f3.3. Для этого мы микроинъектировали синтетическую мРНК *6мус-rou5f3* в эмбрионы *Xenopus laevis* на стадии 2-х бластомеров.

Согласно нашим наблюдениям, отклонения в развитии становились отчетливо видны в процессе органогенеза. Нарушения проявлялись в первую очередь при формировании головных структур эмбриона: наблюдалось уменьшение размера глаз, мозга, деформация присоски (в 25 случаях из 30 зародышей), и реже наблюдалось укорочение оси зародыша (в 15 случаях из 30) (рис. 23).

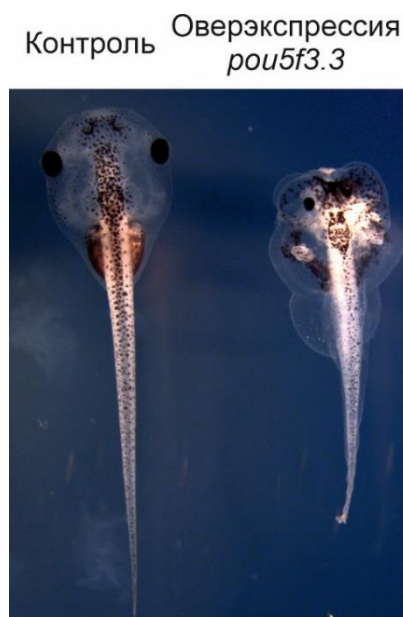


Рис. 23. Оверэкспрессия *rou5f3.3* вызывает дефекты развития *Xenopus laevis*.

Чтобы исследовать какие изменения происходят на молекулярном уровне, мы проверили экспрессию мРНК основных регуляторов плюрипотентности и дифференцировки при оверэкспрессии *rou5f3.3*. Зародыши, микроинъекцированные *btus-rou5f3.3*, собирали на стадии ранней нейрулы (стадия 13), когда в нормальном развитии происходит уменьшение количества транскриптов *rou5f3.3*, и проводили анализ экспрессии выбранных генов методом qRT-PCR.

Полученные данные указывают на то, что оверэкспрессия фактора *rou5f3.3* приводит, в первую очередь, к усилению экспрессии генов-маркеров плюрипотентности, продукты которых подавляют процесс дифференцировки: это гены *klf4* и *klf5* и гены *vent2.1* и *vent2.2*, а также *rou5f3.2*.

Мы показали, что важные для ранней дифференцировки гены, которые экспрессируются и в оогенезе, и после активации зиготического генома: *sox2*, рецепторы ретиноевой кислоты *rxrg* и *rarg*, *wnt8* незначительно уменьшаются. Эти гены обеспечивают начальные этапы дифференцировки, и только *sox2* рассматривается и как маркер плюрипотентности, и как регулятор дифференцировки нейроэктодермы. Также незначительно менялась экспрессия еще одного гена семейства *rou5f3* - *rou5f3.1*.

Кроме того, мы наблюдали значительное подавление экспрессии генов, активно уже после гастрюляции и ответственных за дифференцировку. Так, в зародышах с оверэкспрессией *rou5f3.3* наблюдалось подавление экспрессии генов, кодирующих белки клеточной адгезии, в том числе гены трансмембранных рецепторов, принимающих участие в межклеточных взаимодействиях и связанных с ними белков – *actin*, *claudin*, *zyxin*, *ldb3*. Также падал уровень экспрессии генов семейства *agr*, регулирующих регенерацию и дифференцировку клеток раневой бластемы и участвующих в развитии головных структур – *agl/2* и *agr2* (рис. 24).

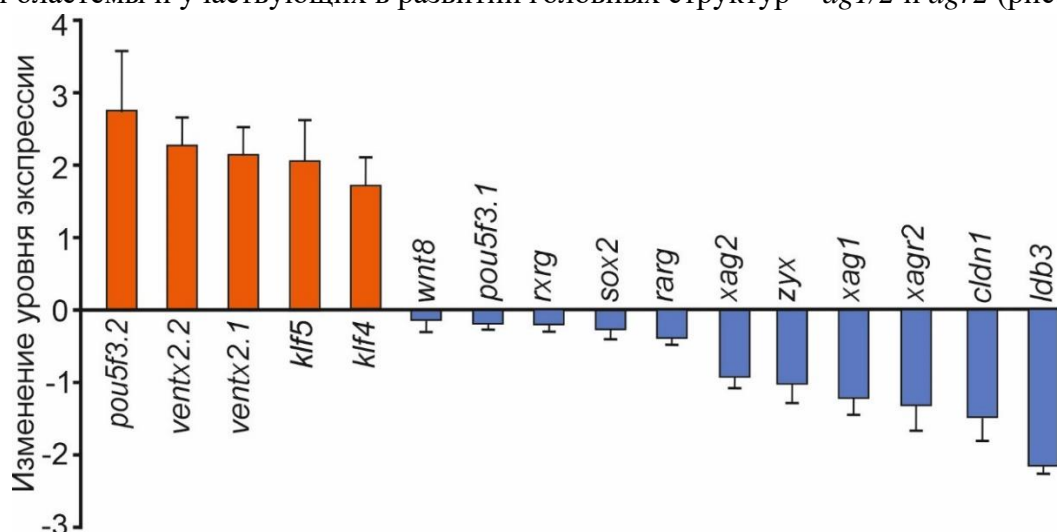


Рис. 24. Оверэкспрессия *rou5f3.3* влияет на экспрессию генов, регулирующих плюрипотентность и дифференцировку. Данные получены с помощью метода qRT-PCR и представлены в виде кратного изменения экспрессии генов. Уровни транскрипции генов домашнего хозяйства *odc* и *efa* использовали для нормализации. Пределы погрешностей показывают стандартное отклонение.

6. Подавление *zyxin* увеличивает уровни мРНК генов плюрипотентности в эмбрионах *Danio rerio* и в культуре клеток человека

В этой работе мы показали, что *Zyxin* может связывать *Ybx1*, тем самым предотвращая взаимодействие *Ybx1* с мРНК *rou5f3*, что стимулирует деградацию этих мРНК. Между тем, другие авторы ранее обнаружили, что у млекопитающих *Ybx1* может связывать мРНК другого

гена плюрипотентности, *NANOG*. Кроме того, было показано, что *Ybx1* может перемещаться в ядро и регулировать экспрессию *NANOG* и что подавление *Ybx1* в клетках млекопитающих снижает экспрессию другого гена плюрипотентности, *POU5F1*. Следовательно, можно предположить, что *ZYXIN* может также регулировать экспрессию *NANOG* и *POU5F1*, путем связывания *Ybx1* и нарушения его функционирования. Чтобы проверить эту гипотезу, мы использовали два типа модельных объектов: эмбрионы *Danio rerio* и клеточную линию человека HEK293.

Мы подавили активность *Zyxin* в эмбрионах *Danio rerio* путем инъекции *anti-zyxin* MO *Danio* и проанализировали концентрации мРНК генов плюрипотентности - *nanog*, *pou5f3* и *klf4* с помощью qRT-PCR. Как и в случае с *pou5f3 Xenopus*, на протяжении всей гастрюляции до стадии хвостовой почки (10-10,3 hpf) наблюдалось явное увеличение концентраций транскриптов *nanog*. Напротив, во время нормального развития концентрации транскриптов *nanog* резко снижаются на стадии средней бластулы (стадия 512 клеток, 2,75-3,0 hpf, рис 25). Концентрации транскриптов *pou5f3* и *klf4* также увеличиваются у эмбрионов *Danio* с нокадауном *zyxin*, но в меньшей степени (рис. 25).

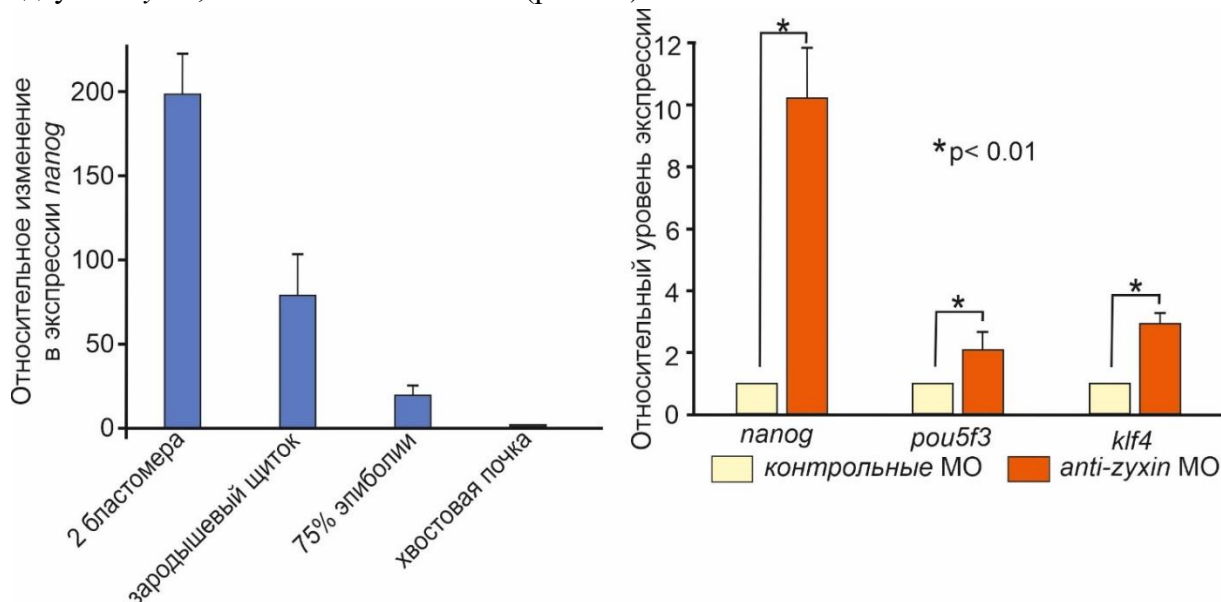


Рис. 25. Экспрессия генов плюрипотентности у эмбрионов *Danio rerio*. Слева: временной профиль экспрессии *nanog* у эмбрионов *Danio rerio*. Справа: данные по экспрессии в зародышах на стадии хвостовой почки с нокадауном *zyxin*, опосредованным инъекцией 0,3 мМ MO.

Так же мы подавили активность *ZYXIN* в человеческих клетках линии HEK293. Для этого мы нокаутировали *ZYXIN* методом CRISPR / Cas9. Клетки трансфицировали каждым из шести предварительно сконструированных векторов, экспрессирующих различные последовательности направляющей РНК для *ZYXIN* человека. После этого, как клетки, выращенные из отдельных клонов, были проверены визуально и обработаны моноклональными антителами. Три вектора, которые наиболее часто приводили к аномальному фенотипу (округлые клетки с низкими адгезивными свойствами) в трансфицированных клетках и не окрашивались антителами к *ZYXIN*, были выбраны для дальнейшей работы.

Для получения стабильных линий клеток с нокаутом *ZYXIN* (KO) клетки трансфицировали одним из трех выбранных векторов *ZYXIN*-CRISPR и индивидуальные клоны выращивали в селективной среде, содержащей пурамицин и верапамил. Клетки,

трансфицированные пустым вектором, использовали в качестве контроля. После выращивания в селективной среде отдельные клоны были изолированы и снова протестированы с помощью иммуофлуоресцентного окрашивания, иммуоблот-анализа с использованием антител к ZYXIN и секвенирования ДНК (рис. 26, 27).

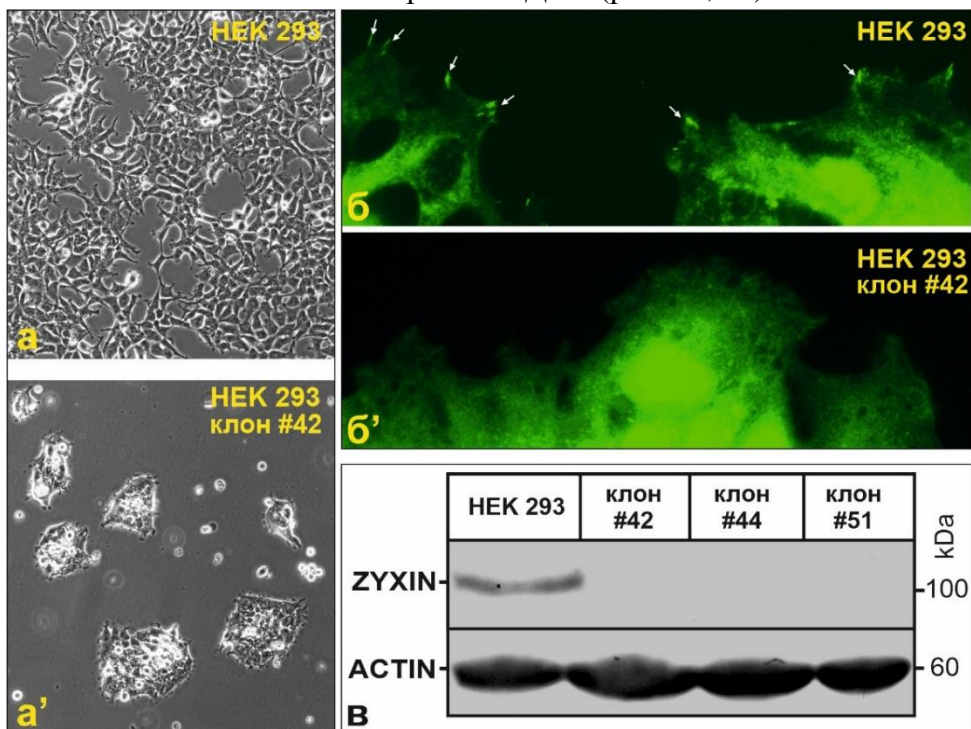


Рис. 26. Результаты нокаута ZYXIN в клетках линии HEK293. а и а' Фенотип контрольных клеток HEK293 и клеток нокаутных по ZYXIN. б и б' Результаты иммуногистохимического окрашивания с антителами к ZYXIN клеток HEK293 с нормальными адгезивными комплексами (стрелки указывают накопление ZYXIN) и клеток с нокаутом ZYXIN. Вестерн-блоттинг образцов контрольных клеток HEK293 и клонов клеток с нокаутом ZYXIN 42, 44 и 51 с моноспецифическими антителами к ZYXIN.

Расположение целевых сайтов для gRNA (подчеркнуты) в гене ZYXIN человека.

РАМ-сайты отмечены красным

CCACSTCCSCTTGCTGGGGATGGCGACGATGCAGAGGGTGTCTGGGAGGTGCSTTCCCG
 P P P L A G D G D D A E G A L G G A F P
 CCGCCCCCTCCCGGATCGAGGAATCATTTCCSCTGCGCCTCTGGAGGAGGAGATCTTC ЭКЗОН 2
 P P P P P I E E S F P P A P L E E E I F
 CSTTCCCGCCGCTCCTCCGGAGGAGGAGGGCCCTGAGGCCCCATACCGCCCCA
 P S P P P P P E E E G G P E A P I P P P
 CCACAGgtacggaggcctgggagggcgctgcaactggacaccccccaaggagaggagaag
 P Q
 интрон 2 agggccctttcttcttacctcccctgcacctctgccttgggggtggggggatagaggcat
 ggaataggtgctctgacctctgacctctagCCCAGGGAGAAGGTGAGCAGTATTGATTT
 P R E K V S S I D L
 GGAGATCGACTCTGTCTCACTGCTGGATGACATGACCAAGAATGATCSTTTCAAAGC ЭКЗОН 3
 E I D S L S S L L D D M T K N D P F K A
 CCGGgtaagggaccggagagtaggaaaagcagggctcagggccagagagactgggcatag
 R
 интрон 3 aactaaggaggatggtgtcctcctgactgcatctctcttccctctcccaccccttgagG
 TGTCACTGGATATGTGCCCCACCAGTGGCCACTCCATTCAGTCCAAGTCCAGTACCA ЭКЗОН 4
 V S S G Y V P P P V A T P F S S K S S T
 AGCCTGCAGCCGGGGCACAGCACCCCTGCSTCSTTGAAGTCCCST
 K P A A G G T A P L P P W K S P

A

Распределение мутаций в клонах 42, 44 and 51 после использования CRISP/Cas9-системы для редактирования ZYXIN

ZYXIN - зеленый, РАМ-сайты - красные, сайты gRNA подчеркнуты, делеции - пунктир, инсерции - черные, стоп-кодон - голубой	Δ п.н.	% мутаций
Делеции в ZYXIN в клоне # 42		
TCCCGCCGCCCCCTCCCGGATCGAGGAATCATTTCCSCTGCGCCTCTGGAGGAGG	0	6
TCCCGCCGCCCCCTCCCGGATCGAGGAATCATTTCCSCTGCGCCTCTGGAGGAGG	-1	24
TCCCGCCGCCCCCTCCCGGATCGAGGAATCATTTCCSCT----CTCTGGAGGAGG	-4	27
TCCCGCCGCCCCCTCCCGGATCGAGGAATCATTTCC-----CTCTGGAGGAGG	-8	43
Делеции в ZYXIN в клоне # 44		
TCCCGCCGCCCCCTCCCGGATCGAGGAATCATTTCCSCTGCGCCTCTGGAGGAGG	0	10
TCCCGCCGCCCCCTCCCGGATCGAGGAATCATTTCCSCTGCGCCTCTGGAGGAGG	-1	1
TCCCGCCGCCCCCTCCCGGATCGAGGAATCATTTCCSCT----CTCTGGAGGAGG	-4	1
TCCCGCCGCCCCCTCCCGGATCGAGGAATCATTTCC-----CTCTGGAGGAGG	-8	2
Инсерции в ZYXIN в клоне # 44		
CCCCGATCGAGGAATCATTTCCSCTGCGCTAGGCTCCAATCCATGGGGTTGCAGA P P I E E S F P P A L G S N P W G C R GTTGGACACAAC TGC GCGCAGAGCTGGAGCTCCGCGGTGTGGAAGTACAGAATGAA V G H N C A Q S W S S A G V E V Q N E GCAGGAAAAGGCTAATAAAGTTTTGCCAAGACATCAGTAAACACCSTCTTCC A G K R L I K F C Q D I T - Q T P S S AACAACACAGAGAAGACTCTACACATGGACATCACTCTGGAGGAGGAGATCTTCCST N N T E K T L H M D I T L E E E I F P	+175	86
Делеции в ZYXIN в клоне #51		
CCTCTCCACCCCTTGCAGGTGTCACTGGATATGTGCCCCACCAGTGGCCACTCC	0	3
CCTCTCCACCCCTTGCAGGTGTCACTGGATATGTGCCCC--CCAGTGGCCACTCC	-1	48
CCTCTCCACCCCTTGCAGGTGTCACTGGATATGC-----CAGTGGCCACTCC	-8	49

B

Рис. 27. Частота мутаций в последовательности ZYXIN для 2-го и 4-го экзонов в результате нокаута ZYXIN в клетках линии HEK293 с помощью системы CRISPR/Cas9. Примеры делеций и инсерций, полученных в результате нокаута ZYXIN с помощью системы CRISPR/Cas9.

Когда клоны с нокаутированным ZYXIN были протестированы с помощью qRT-PCR, было выявлено увеличение количества транскриптов генов плюрипотентности. Наиболее

сильно увеличилась концентрация транскриптов *NANOG* (рис. 28), что также наблюдалось у эмбрионов *Danio rerio* с нокдауном *zyxin*. Более слабое увеличение экспрессии было обнаружено в случае мРНК *KLF4* и *POU5F1 / OCT4*.

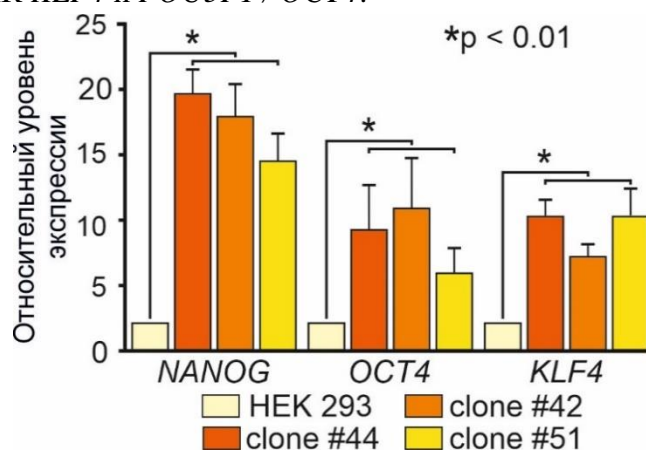


Рис. 28. Регулирование уровней транскриптов генов плюрипотентности в клетках HEK293 человека с помощью *ZYXIN*. Данные qRT-PCR на стабильных клонах 42, 44 и 51 клеточной линии *ZYXIN-KO HEK293*.

Таким образом данные, полученные в настоящей работе, указывают на то, что *Zyxin* может играть роль общего регулятора плюрипотентности в эмбриональных клетках, который подавляет активность генов плюрипотентности, таких как *pou5f3*, *POU5F1*, *Klf4*, *NANOG*.

ВЫВОДЫ

1. Подавление трансляции белка *Zuxin* приводит к увеличению уровня мРНК фактора плюрипотентности *pou5f3.3* в эмбрионах шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*). Специфичность этого эффекта подтвердилась в опытах по восстановлению нормальной экспрессии белка *Zuxin*.
2. Подавление трансляции белка *Zuxin* не активирует участок (- 2523 п.н.) промотора гена *pou5f3.3*.
3. При общем подавлении транскрипции сохраняется увеличение количества транскриптов *pou5f3.3*, что может быть связано с уменьшением уровня деградации мРНК.
4. Уровень деградации мРНК генов семейства *pou5f3* может регулироваться через взаимодействие с РНК-связывающим белком *Ybx1*. *Zuxin* препятствует образованию этого комплекса.
5. Количество транскриптов других генов плюрипотентности *klf4*, *vent2.1*, *vent2.2* увеличивается при нокадауне *zuxin* не вследствие образования комплекса между мРНК и белком *Ybx1*, а за счет оверэкспрессии *pou5f3.3*.
6. При нокадауне *zuxin* у эмбрионов *Danio rerio* наблюдается увеличение количества мРНК генов-регуляторов плюрипотентности (*nanog*, *pou5f3*, *klf4*), нокаут *ZYXIN* в клетках линии НЕК293 приводит к тому же результату – увеличивается количество транскриптов генов *NANOG*, *OCT4*, *KLF4*.

Список работ, опубликованных по теме исследования

Статьи

1. Martynova N.Y., **Parshina E.A.**, Zaraisky A.G. Cytoskeletal protein Zyxin in embryonic development: from controlling cell movements and pluripotency to regulating embryonic patterning // *FEBS J.* 2022. DOI: 10.1111/febs.16308.
2. Martynova N.Y., **Parshina E.A.**, Zaraisky A.G. Using RNA-binding proteins for immunoprecipitation of mRNAs from *Xenopus laevis* embryos // *STAR Protocols.* 2021. V. 2(2). P. 100552. DOI: 10.1016/j.xpro.2021.100552.
3. Martynova N.Y., **Parshina E.A.**, Zaraisky A.G. Protocol for separation of the nuclear and the cytoplasmic fractions of *Xenopus laevis* embryonic cells for studying proteins shuttling // *STAR Protocols.* 2021. V. 2(2). P. 100449. DOI: 10.1016/j.xpro.2021.100449.
4. **Parshina Elena A.**, Eroshkin Fedor M., Orlov Eugeny E., Gyoeva Fatima K., Shokhina Arina G., Staroverov Dmitry B., Belousov Vsevolod V., Zhigalova Nadezhda A., Prokhortchouk Egor B., Zaraisky Andrey G., Martynova Natalia Y. Cytoskeletal Protein Zyxin Inhibits the Activity of Genes Responsible for Embryonic Stem Cell Status // *Cell Reports.* 2020. V. 33(7). p. 108396. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108396.
5. **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. Т. 46, № 6, с. 719–728. DOI: 10.2139/ssrn.3554017.
6. Мартынова Н.Ю., **Паршина Е.А.**, Ерошкин Ф.М., 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. Т. 46, № 4, с. 396-403. DOI: 10.31857/S013234232004020X.
7. Tereshina Maria B., Ivanova Anastasiya S., Eroshkin Fedor M., Korotkova Daria D., Nesterenko Alexey M., Bayramov Andrey V., Solovieva Elena A., **Parshina Elena A.**, Orlov Eugeny E., Martynova Natalia Y., Zaraisky Andrey 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. V. 57, № 5, p. e23293. DOI: 10.1002/dvg.23293.
8. Martynova N.Y., **Parshina E.A.**, Ermolina L.V., Zaraisky 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. V. 504, № 1, pp. 251-256. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.08.164.

Тезисы конференций

1. **Е.А. Паршина**, Н.Ю. Мартынова, А.Г. Зарайский. Роль цитоскелетного белка Zyxin в регуляции экспрессии генов ядерных рецепторов ретиноевой кислоты *rarg* и *rxrg* в эмбриональном развитии шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*). Конференция молодых ученых «АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ», Москва, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, 12-14 октября 2021.
2. **Паршина Е.А.**, Мартынова Н.Ю., Ерошкин Ф.М., Орлов Е.Е., Зарайский А.Г. Цитоскелетный белок Zyxin участвует в регуляции процессов клеточной дифференцировки в нормальном развитии шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. XXXII Зимняя молодёжная научная школа, Москва, Институт Биоорганической химии РАН, Россия, 10-13 февраля 2020.

3. **Parshina Elena A.**, Martynova Natalia Yu., Eroshkin Fedor M., Orlov Eugeny E., Zاراisky Andrey G. The cytoskeletal protein Zyxin regulates mRNA level of the transcription factor Oct60/Pou5f3.3 by interacting with FRGY1mRNA binding protein. *European Amphibian Club 2019, Lutherstadt-Wittenberg, Германия, 26-29 июня 2019.*
4. **Parshina E.A.**, Martynova N.Y., Eroshkin F.M., Orlov E.E., Zاراisky A.G. The cytoskeletal protein Zyxin regulates the level of the pluripotency factor Oct60 mRNA in the *Xenopus laevis* embryo. *43rd FEBS 2018 Congress, Prague, Czech Republic, 7-12 July 2018.*
5. **Паршина Елена Анатольевна.** Роль цитоскелетного белка Zyxin в регуляции экспрессии генов Pou5f3 в ходе раннего развития эмбрионов шпорцевой лягушки». *ЛОМОНОСОВ, Москва, Россия, 9-13 апреля 2018.*
6. **Паршина Е.А.** Ерочкин Ф.М., Зарайский А.Г., Мартынова Н Ю. Роль цитоскелетного белка Zyxin в регуляции транскрипции генов pou5f3 в ходе раннего развития эмбрионов шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*). *XXX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико- химической биологии и биотехнологии», Учебно-научный центр ИБХ РАН , Россия, 12-15 февраля 2018.*