

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
Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Мартынова Наталья Юрьевна,
кандидат биологических наук

Москва - 2022

Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ.....	4
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ	6
2.1. Белок Zuxin - регулятор клеточной адгезии и экспрессии генов	6
2.1.1. Молекулярная структура белка Zuxin	7
2.1.2. Zuxin участвует в организации клеточных контактов	8
2.1.3. Zuxin регулирует эпителиально-мезенхимальный переход.....	10
2.1.4. Zuxin в эмбриональном развитии и поддержании плюрипотентности	11
2.2. Плюрипотентность.....	13
2.2.1. Факторы плюрипотентности, регулирующие эмбриональное развитие <i>Xenopus laevis</i>	13
2.2.2. Семейство транскрипционных факторов Pou	14
2.2.3. Pou5f3 в развитии <i>Xenopus laevis</i> подавляют дифференцировку клеток	18
2.3. Эмбриональное развитие регулируется механизмами сохранения и деградации материнских мРНК.....	22
2.3.1. Строение и свойства Ybx1	23
2.3.2. Взаимодействие Ybx1 с РНК.....	25
2.3.3. Взаимодействие Ybx1 с белками.....	27
2.3.4. Ybx1 - маркер клеточных перерождений	28
2.3.5. Ybx1 играет важную роль в позднем эмбриогенезе.....	29
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	32
3.1. Материалы.....	32
3.1.1. Реактивы и оборудование.....	32
3.1.2. Буферы, растворы, среды	37
3.2. Методы.....	46
3.2.1. Манипуляции с эмбрионами <i>Xenopus laevis</i> и <i>Danio rerio</i>	46
3.2.2. Высокопроизводительное секвенирование	47
3.2.3. Выделение тотальной РНК и синтез кДНК.....	47
3.2.4. Анализ результатов методом ПЦР в реальном времени	48
3.2.5. Создание генетических конструкций.....	54
3.2.6. Транскрипция <i>in vitro</i>	59
3.2.7. Гибридизация <i>in situ</i>	60

3.2.8. Анализ экспрессии эндогенного белка Pou5f3.3: получение специфических антител к Pou5f3.3, гель-электрофорез и иммуноблоттинг	63
3.2.9. Исследование способности к дифференцировке под влиянием активина А	64
3.2.10. Анализ данных с люциферазного репортера	64
3.2.11. Блокирование транскрипции актиномицином D	65
3.2.12. Анализ белок-белковых взаимодействий	65
3.2.13. Разделение ядерной и цитоплазматической фракций	66
3.2.14. РНК-иммунопреципитация (RIP)	66
3.2.15. Обработка лептомицином В	66
3.2.16. Нокаут CRISPR / Cas9	67
4. РЕЗУЛЬТАТЫ	69
4.1. Выявление генов, экспрессия которых изменяется в ответ на подавление трансляции <i>zuxin</i>	69
4.2. Повышение уровня мРНК <i>pou5f3.3</i> происходит вследствие замедления деградации материнских транскриптов, а не из-за активации транскрипции.	77
4.3. <i>Zuxin</i> препятствует образованию комплексов между мРНК <i>pou5f3</i> и белком <i>Ybx1</i>	80
4.4. Оверэкспрессия <i>ubx1</i> и задержка <i>Zuxin</i> в клеточном ядре увеличивает уровни мРНК <i>pou5f3</i>	85
4.5. Увеличение количества мРНК других генов плюрипотентности может происходить за счет связывания с <i>Ybx1</i> или вследствие оверэкспрессии фактора <i>pou5f3.3</i>	89
4.6. Подавление <i>zuxin</i> увеличивает уровни мРНК генов плюрипотентности в эмбрионах <i>Danio rerio</i> и в культуре клеток человека	93
5. ОБСУЖДЕНИЕ	98
6. ВЫВОДЫ	104
7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	105
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	107

1. ВВЕДЕНИЕ

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 - цитоскелетный белок, который играет важную роль в регуляции миграции, адгезии, пролиферации и дифференцировки клеток (Beckerle, 1997). Основная молекулярная функция *Zyxin* - контроль сборки актиновых филаментов посредством взаимодействий с несколькими белками, участвующими в формировании клеточных контактов (Schmeichel and Beckerle, 1994). Кроме того, *Zyxin* может перемещаться в ядро при определенных условиях и модулировать экспрессию генов (Nix and Beckerle, 1997). В частности, сообщалось, что *Zyxin* перемещается в ядро, когда к клетке прилагается внешнее механическое напряжение (Sun et al., 2012).

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 (Ma et al., 2016; Kouwaki et al., 2017). Поэтому было

особенно интересно изучить возможные функции *Zuxin* в регуляции экспрессии генов во время эмбриогенеза, когда связь морфогенетических движений с экспрессией генов чрезвычайно важна.

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

Сравнивая транскриптомы осевых тканей эмбрионов *Xenopus laevis* дикого типа и тех же тканей с нокдауном *zuxin*, мы обнаружили, что нокдаун *zuxin* снижает экспрессию значительного числа генов, регулирующих клеточный цикл и дифференцировку клеток, адгезию и метаболизм. Более того, ингибирование *Zuxin* значительно увеличивало экспрессию генов, связанных с поддержкой статуса стволовых клеток: *rou5f3.1*, *rou5f3.2* и *rou5f3.3* (эти гены семейства *rou5f3* являются гомологами *POU5F1* млекопитающих), *klf4* и *vent2.1 / 2* (функциональные гомологи гена *NANOG* млекопитающих (Scerbo et al., 2012)).

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

- Подтвердить влияние *Zuxin* на гены плюрипотентности семейства *rou5f3* и проанализировать специфичность этого влияния
- Определить механизм влияния *Zuxin* на количество транскриптов *rou5f3*
- Осуществить поиск белков-партнеров *Zuxin*, 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.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ

2.1. Белок Zuxin - регулятор клеточной адгезии и экспрессии генов

Zuxin – эволюционно консервативный белок, который участвует в регуляции сборки актина и в основном концентрируется в области фокальных и адгезионных контактов (Drees et al., 1999). Название белка происходит от греческого слова *zeuxis*, что означает «присоединение» и отражает особенности его локализации (Beckerle, 1997).

Несмотря на то, что Zuxin в основном концентрируется в области клеточных контактов, часть белка локализована в ядре (Yamamura et al., 2013). Многочисленные исследования (Hirata et al., 2008; Wang and Gilmore, 2003; Yoshigi et al., 2005) выявили механочувствительные свойства белка Zuxin. Связываясь с другими белками, он может проникать в ядро в ответ на механическую стимуляцию, и выводится из ядра благодаря наличию специфической аминокислотной последовательности - NES. Благодаря способности перемещаться между цитоплазмой и ядром (Hervy et al., 2006), Zuxin может рассматриваться в качестве белка-механотрансдуктора, способного переводить преобразование механических натяжений в изменение генной экспрессии (Nix and Beckerle, 1997; Uemura et al., 2011).

При ингибировании Zuxin меняется морфология клеток с эпителиальной на фибробластную, снижаются адгезионные свойства клеток, уменьшается их коллективная миграция, снижается способность создавать актиновые стрессовые волокна в ответ на химический стимул. Таким образом, Zuxin является потенциальным маркером эпителиально-мезенхимального перехода (Yamamura et al., 2013).

2.1.1. Молекулярная структура белка Zyxin

Белок Zyxin *X. laevis* состоит из 664 аминокислот, молекулярной массой 69,946 Da и представлен тремя регионами: пролин-богатой N-концевой областью, двумя лейцин-богатыми сигналами экспорта из ядра (NES) и тремя LIM-доменами (рис. 1) (Martynova et al, 2008).

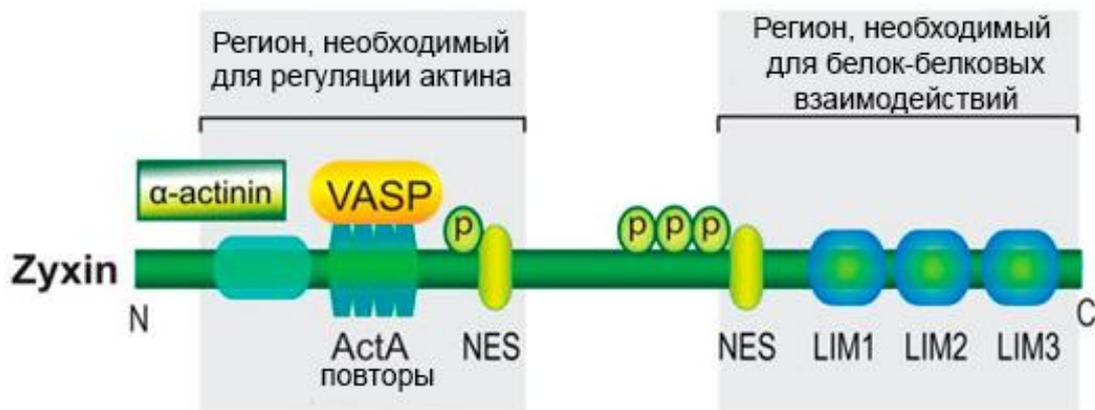


Рис.1. Доменная организация белка Zyxin (по Smith et al., 2014)

N-конец Zyxin, в первую очередь, необходим для взаимодействия цитоскелетными белками, а именно белок сшивающий актиновые филаменты α -actinin (Li and Trueb, 2001; Reinhard et al., 1999), модулятор сборки актина Ena / VASP (Steele et al., 2012), цитоскелетные белки LASP-1 и LASP-2 (Li et al., 2004). Пролин-богатые повторы в Zyxin имеют поразительное сходство с пролин-богатыми последовательностями, обнаруженными в белке ActA внутриклеточного патогена *Listeria monocytogenes* (Beckerle, 1997), бактериального вида, заражающего клетки млекопитающих, и чья патогенность обуславливается способностью собирать актиновые филаменты на поверхности клетки. Белок ActA рекрутирует белки клеточных контактов Ena / VASP на место сборки актина (Fradelizi et al., 2001). Благодаря наличию у Zyxin пролин-богатых повторов, он, так же как ActA, является посредником в соединении членов семейства Ena / VASP с актином и может облегчать изменения актинового цитоскелета в эукариотических клетках (Oldenburg et al., 2015).

Лейцин-богатые области — NES (nuclear export signal) — позволяют Zyxin связываться с белком CRM1 и перемещаться между адгезионными контактами и клеточным ядром (Beckerle, 1997; Dong et al., 2009).

Третья характерная структура, находящаяся на С-концевом участке Zyxin — три LIM-домена. LIM-домен — это Cys- и His-богатый мотив длиной приблизительно 60 аминокислот. Каждый LIM-домен имеет структуру двух цинковых пальцев. LIM-домены опосредуют специфические белок-белковые и белок-ДНК взаимодействия (Kadmas and Beckerle, 2004). Мотив LIM был идентифицирован в ряде белков, которые, как правило, участвуют в контроле генной экспрессии и дифференцировки клеток (Beckerle, 1997).

2.1.2. Zyxin участвует в организации клеточных контактов

Во время эмбрионального развития и во взрослых тканях между клетками и клеточными пластами возникают механические натяжения: эпителиальные пласты растягиваются и деформируются во время эмбрионального развития (Fournier et al., 2010), сокращение мышц способствует ремоделированию соединительной ткани (Ateshian and Humphrey, 2012), а сосудистый эндотелий приспособливается к изменениям артериального давления (Deanfield et al., 2007). Чтобы минимизировать механическое повреждение клеток и поддерживать гомеостаз тканей, механические силы, действующие извне, должны быть уравновешены силами внутри клетки, что осуществляется за счет жесткости цитоскелета (Chen, 2008). Воспринимая механические натяжения через фокальные и адгезионные контакты и передавая их внутрь через актиновый цитоскелет, клетка реагирует на их изменение, регулируя сигнальные пути и сократимость (Cramer et al., 1997). Кроме того, экспрессия генов в живых клетках может регулироваться механическими стимулами (Wang, 2007). Нарушение регуляции механических натяжений приводит к ряду заболеваний, таких как нейрональная и мышечная дегенерация (Suchyna and Sachs, 2007),

потенциальные нарушения иммунной системы (Matheson et al., 2006), гипертония (Huang, 2014) и поликистоз почек (Delmas, 2004).

Белок Zyxin, входящий в состав фокальных и адгезионных контактов, чувствителен к механическим натяжениям в актиновом цитоскелете (Schiller et al., 2011). Взаимодействуя с другими белками этих комплексов: α -актенином, члены семейства цистеин-богатых белков (cysteine-rich protein — CRP), Vav и члены семейства Ena/VASP, он участвует в стабилизации клеточных контактов (Beckerle, 1997) (рис. 2).

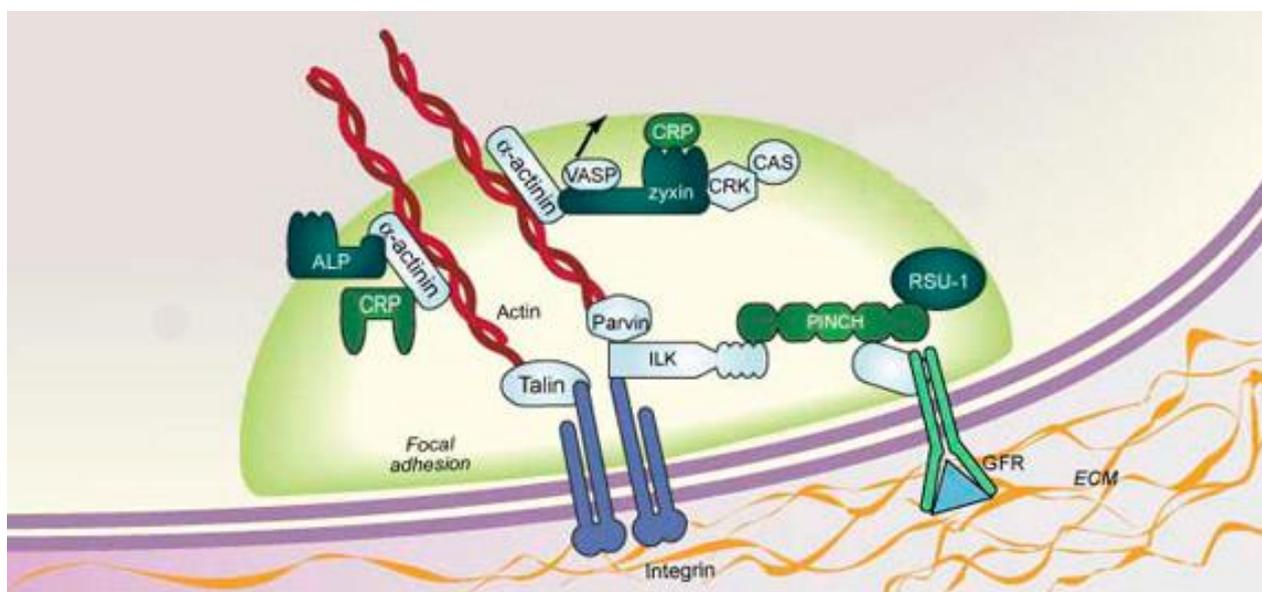


Рис. 2. Модель фокального контакта. ALP – щелочная фосфатаза, CAS - Crk-associated substrate, CRP - cysteine-rich protein, ECM – внеклеточный матрикс, FAK - focal adhesion kinase, GFR - growth factor receptor, ILK - Integrin Linked Kinase RSU-1 - Ras suppressor protein 1, VASP - vasodilator-stimulated phosphoprotein (по Hervy et al., 2006).

В обоих типах контактов Zyxin выступает в качестве связующего звена между основными белками контактов α -катенином в адгезионных контактах или α -актенином в фокальных контактах и актином. Связываясь с актином своей N-концевой частью, он рекрутирует на него белки семейства Ena / VASP и TES (Oldenburg et al., 2015). Нарушение взаимодействия Zyxin-VASP вызывает неправильную локализацию VASP и нарушение ремоделирования актина (Hoffman et al., 2012).

Так как Zuxin играет ключевую роль в формировании и поддержании структуры актиновых микрофиламентов, а α -актинин необходим для образования актиновых структур на экзосомах, дефицит Zuxin приводит к нарушению экзоцитоза. Так, Zuxin необходим для образования актиновых структур на тельцах Вайбеля-Паладе, содержащих фактор фон Виллебранда и Р-селектин и секретируют их при повреждении эндотелия, дефицит Zuxin нарушает эпинефрин-индуцированную эндотелиальную секрецию фактора фон Виллебранда (Han et al., 2016).

Для перестройки сайтов адгезии, которой они подвергаются постоянно, важной является способность Zuxin модулировать свою активность через взаимодействие его N- и C-концевых участков. Взаимодействие по типу “голова-хвост” приводит к уходу Zuxin из контактов. В то время как разрушение этого взаимодействия за счет фосфорилирования Zuxin по 142 серину обеспечивает его взаимодействие с другими белками клеточных контактов (Call et al., 2011). Недавно было также показано, что в некоторых случаях протеолиз Zuxin по сайту серинпептидазы 1 HtrA, расположенному в его N-концевой области. Усеченная форма Zuxin транслоцируется в ядро (Sabino et al., 2020).

2.1.3. Zuxin регулирует эпителиально-мезенхимальный переход

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) имеет фундаментальное значение для гомеостаза тканей, эмбрионального развития и прогрессии раковых заболеваний (Thiery, 2002). Ремоделирование тканей требует изменения формы, миграции и адгезии клеток, все эти процессы зависят от актинового цитоскелета (Mege et al., 2006). Особенно важна пластичность адгезионных контактов, которые объединяют отдельные клетки в эпителиальные пласты (Ivanov, 2008). Во время ремоделирования эпителиальных тканей отдельные клетки могут полностью отделяться от эпителия и самостоятельно переноситься в отдаленные места для создания новых тканей, как при деламинации нервного гребня, или же,

изменения формы и положения клеток могут координироваться внутри эпителиальных тканей без потери клеточной адгезии, как при конвергентном растяжении, разветвленном морфогенезе или тубулогенезе (Sperry et al., 2010).

Не удивительно, что Zyxin, связывающий актиновый цитоскелет со структурами клеточных контактов, играет ключевую роль в ЭМП. Регуляция активности Zyxin через фосфорилирование по 142 серину определяет тип миграции клеток - одиночная миграция или движение в пласте. Ключевым моментом в определении типа миграции является взаимодействие N-концевой области Zyxin с VASP. Мутантные клетки, экспрессирующие Zyxin без LIM-доменной области, в которых отсутствует регуляция по типу “голова-хвост”, не способны полностью отделяться друг от друга и мигрируют коллективно (Sperry et al., 2010).

Кроме того, миграция клеток осуществляется за счет их взаимодействия с субстратом. В этом процессе Zyxin участвует в образовании стрессовых фибрилл, которые обеспечивают сокращение клетки, обеспечивающие ее движение (Zavadil and Bottinger, 2005).

2.1.4. Zyxin в эмбриональном развитии и поддержании плюрипотентности

Как транскрипционный фактор белок Zyxin играет важную роль в формировании нервной системы. Так, этот белок необходим для регуляции центрального паттерна нервной системы, который основан на дорзо-вентральном градиенте передачи сигналов Sonic hedgehog (Shh). Zyxin может связывать и подавлять активность первичного эффектора сигнального каскада Shh, фактора транскрипции Gli1 - он необходим для уменьшения передачи сигналов Shh в дорзальной части нервной трубки эмбриона *Xenopus laevis* (Martynova et al, 2013).

Кроме того, на *Xenopus laevis* была показана способность Zuxin связывать транскрипционный фактор Xanf1 (Martynova et al, 2008). Во время нейруляции Xanf1 подавляет экспрессию генов, которые в норме должны экспрессироваться постериорнее переднего конца нервной пластинки, тем самым определяя территорию, на которой регуляторы развития переднего мозга затем начинают экспрессироваться (Erмаkova et al., 2007). Взаимодействуя через свой 2-й Lim домен с репрессорным домом типа EN1 Anf / Hesx1, Zuxin может ингибировать функцию Anf / Hesx1 как репрессора транскрипции (Martynova et al, 2008).

Являясь белком клеточных контактов, Zuxin участвует в поддержании натяжений в процессе морфогенеза. Неудивительно, что Zuxin у мыши экспрессируется в течение всего эмбрионального развития и во всех тканях взрослого организма. Однако у мутантных мышей *Zuxin*^{-/-} нет явных аномалий в строении тканей. Это может быть связано с компенсаторным действием членов семейства Zuxin - LPP и TRIP6 (Hoffman et al., 2003).

Так как Zuxin - белок клеточных контактов, изменение его экспрессии может быть маркером клеточных перерождений. Известно, что концентрация Zuxin значительно увеличена в клетках меланомы, по сравнению с меланоцитами. Его экспрессия непосредственно связана с распространением и пролиферацией клеток и находится в обратной зависимости от дифференцировки (van der Gaag et al., 2002).

Однако роль Zuxin в онкологических процессах не ограничивается его участием в регуляции клеточных взаимодействий. Показано участие Zuxin в поддержании плюрипотентности при опухолеобразовании. LIM-домен белка Zuxin в ответ на гипоксию и TGF- β сигналинг, образует четвертичный комплекс с Siah2 и Lats2, тем самым стабилизирует их взаимодействие, в результате которого Lats2 деградирует, деактивируется Hippo-сигналинг. Свободный от Lats2 транскрипционный фактор Yap переходит из цитоплазмы в ядро, что способствует прогрессии опухоли (Ma et al., 2016).

К этому стоит добавить, что в этой работе методом высокопроизводительного секвенирования транскриптомов зародышей шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) с подавленной трансляцией *zuxin* и контрольных эмбрионов было показано увеличение количества транскриптов генов *pou5f3*, факторов транскрипции, которые являются важными регуляторами плюрипотентности, дифференцировки и раннего развития у позвоночных.

2.2. Плюрипотентность

Плюрипотентность и дифференцировка являются двумя ключевыми противоположными процессами, поддерживающими клеточный гомеостаз. Поддержание баланса между этими процессами важно не только в ранних эмбрионах и эмбриональных стволовых клетках, но также имеет критическое значение во время органогенеза и морфогенеза для контроля формирования дифференцированных популяций клеток из мультипотентных клеток-предшественников.

Сопутствующие действия цис- и транс-действующих элементов организуют ранние программы развития, влияя на каскад событий, что приводит к функциональной плюрипотентности. (Paranjpe and Veenstra, 2015).

2.2.1. Факторы плюрипотентности, регулирующие эмбриональное развитие *Xenopus laevis*

Оплодотворенная яйцеклетка тотипотентна, поэтому она может дать начало целому организму. В процессе развития клетки теряют стволовые свойства и дифференцируются.

Известно, что несколько факторов транскрипции, обычно Pou5f1 / Oct4, Sox2, Nanog и Klf4 являются основными регуляторами плюрипотентности в эмбриональных стволовых клетках млекопитающих (Boyer et al., 2005).

Изменения уровней этих факторов плюрипотентности в эмбриональных стволовых клетках будут вызывать дифференцировку в клон-специфические типы клеток (Нау et al., 2004; Li et al., 2007), что указывает на необходимость этих факторов для определения клеточной судьбы. Более того, эти факторы позволяют терминально дифференцированным клеткам приобретать плюрипотентные свойства, которые являются типичными чертами эмбриональных стволовых клеток (Takahashi and Yamanaka, 2006). Тем не менее, факторы, полученные в экспериментах с ES-клетками, которые культивируются в специально приготовленных средах, не отражают реальную ситуацию происходящую в эмбриональном развитии позвоночных животных. Из четырех факторов плюрипотентности ген, гомологичный *Oct4*, был идентифицирован у *Xenopus* (Hinkley et al., 1992), рыбки данио (Burgess et al., 2002), аксолотля (Bachvarova et al., 2004) и курицы (Lavial et al., 2007). Гены *sox2* и *klf4* также консервативны у позвоночных, но профили экспрессии на ранних этапах эмбрионального развития несколько различаются. В то время как *sox2* демонстрирует и материнскую, и зиготическую транскрипцию у мышей, у *Xenopus* этот ген начинает транскрибироваться только после активации собственного генома зародыша. *Klf4* напротив не демонстрирует материнской транскрипции у мышей (Ehlermann et al., 2003), но у *Xenopus* транскрибируется и оогенезе и после активации собственного генома зародыша (Cao et al., 2012). Ген гомологичный *Nanog* был найден у рыбки данио (Schuff et al., 2012), аксолотля (Dixon et al., 2010) и курицы (Canon et al., 2006), но не у *Xenopus* (Scerbo et al., 2012; Schuff et al., 2012), что позволяет предположить, что *Nanog* может быть потерян в роде *Xenopus*.

2.2.2. Семейство транскрипционных факторов Pou

Белки семейства Pou (Pit-Oct-Unc) - важные транскрипционные факторы, имеющиеся у всех многоклеточных животных (Gold et al., 2014). Pou-домен, образованный 160 аминокислотами, состоит из двух высоко консервативных

субдоменов С-концевого Pou_H гомеодомена, состоящего из 60 аминокислот, и N-концевого специфического Pou_S-домена из 75 аминокислот. Несмотря на то, что оба субдомена необходимы для специфического связывания с последовательностью ДНК, Pou_H- и Pou_S-сегменты структурно независимы и связаны через подвижный линкер. Такая структура способствует взаимодействию с белками и ДНК (Ryan and Rosenfeld, 1997).

Семейство генов *Pou* включает в себя 6 классов транскрипционных факторов PouI-PouVI. Последовательности, кодирующие классы PouI, PouIII, PouIV и PouVI имеются у всех многоклеточных животных, класс PouII появляется у билатерий, PouV - только у позвоночных животных. Классы генов *PouII* и *PouV* наиболее вероятно, произошли от *PouIII*.

Ost белки являются подклассом семейства факторов транскрипции Pou и включают PouII, PouIII и PouV классы, которые связаны не только структурно, но и эволюционно (Onichtchouk, 2016).

Гены *rouV* регулируют поддержание плюрипотентности и дифференцировки клеток (Morrison and Brickman, 2006). Челюстные позвоночные обладают одним или двумя родственными белками класса PouV: Pou5f1 и Pou5f3. В геноме черепах, латимерий, сумчатых млекопитающих и саламандр в геноме есть оба гена *Pou5f1* и *Pou5f3*. У костистых рыб, бесхвостых амфибий и птиц сохранился только *Pou5f3*, у змей, ящериц и плацентарных млекопитающих – только *Pou5f1* (рис. 3). *Pou5f2*, по-видимому, является результатом ретротранспозиции *Pou5f1* у общего предка грызунов и приматов и специфически экспрессируется при дифференцировке мужских половых клеток до мейоза (Onichtchouk, 2016).

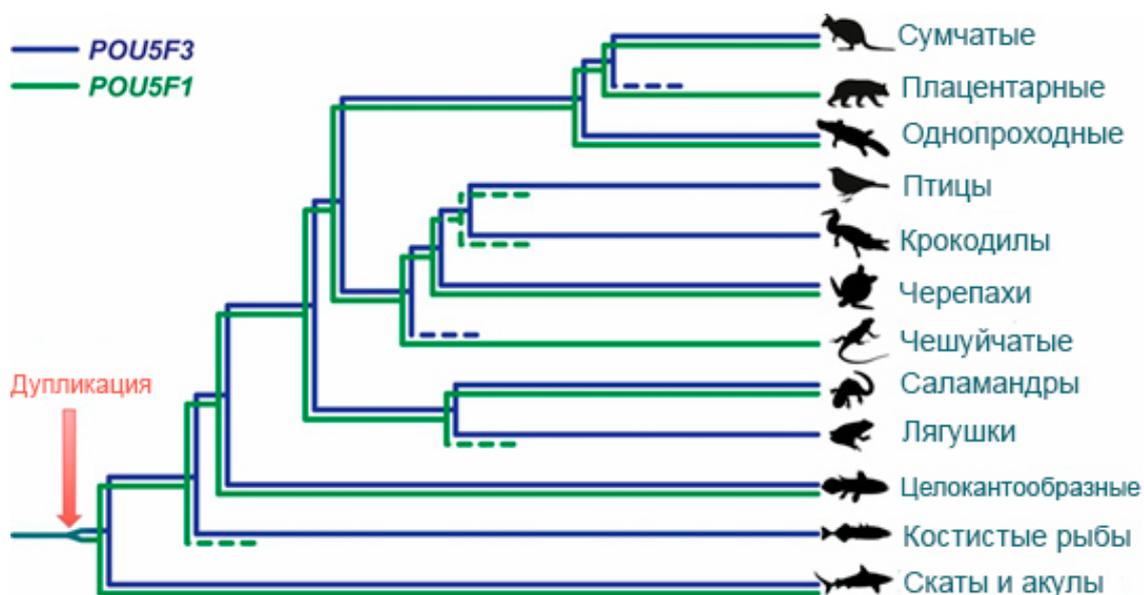


Рис. 3. Схема, показывающая эволюцию генов *PouV* у позвоночных. Пунктирные линии указывают, где гомолог был потерян во время эволюции (по Frankenberg et al., 2014).

Белок Oct4, который кодируется геном класса *PouV* - *Pou5f1*, экспрессируется в плюрипотентных клетках, таких как эмбриональные стволовые клетки и клетки внутренней клеточной массы (Rosner et al., 1990). Экспрессия Oct4 не ограничивается плюрипотентными клетками в преимплантационных эмбрионах, белок Oct4 все еще присутствует после имплантации, во время гаструляции и в дальнейшем развитии (Downs, 2008). Oct4 необходим для индукции плюрипотентных клеток из соматических клеток в экспериментах по перепрограммированию (Takahashi and Yamanaka, 2006). Удивительно, что, несмотря на роль Oct4 в поддержании плюрипотентности, этот фактор также участвует в спецификации отдельных типов клеток (Radzishewska et al., 2013). Например, Oct4 участвует в ранних стадиях экстраэмбриональной спецификации эндодермы в бластоцистах мыши (Frum et al., 2013). Oct4 регулирует такие противоположные процессы как поддержание плюрипотентности и спецификацию пути дифференцировки, т.к. он работает на последовательных стадиях в разных генных сетях. Хотя генные сети, поддерживающие плюрипотентность, хорошо охарактеризованы, Oct4-зависимый регуляторный механизм определения клеточной судьбы до сих пор не ясен (Onichtchouk, 2016).

Внутри эмбриона потеря *Oct4* приводит к потере способности клеток бластоцисты дифференцироваться в разные линии. Вместо этого клетки становятся внеэмбриональной трофобластической оболочкой (Nichols et al., 1998).

Xenopus имеет три гена *pou5f3*, которые возникли в результате тандемной дупликации: *pou5f3.3* (*oct60*) – экспрессируется в ооцитах и присутствует в эмбрионах до стадии гаструлы (Morichika et al., 2014), *pou5f3.2* (*oct25*) и *pou5f3.1* (*oct91*) экспрессируются во время гаструляции и ограничено у взрослых животных в почках и мозге соответственно (Hinkley et al., 1992).

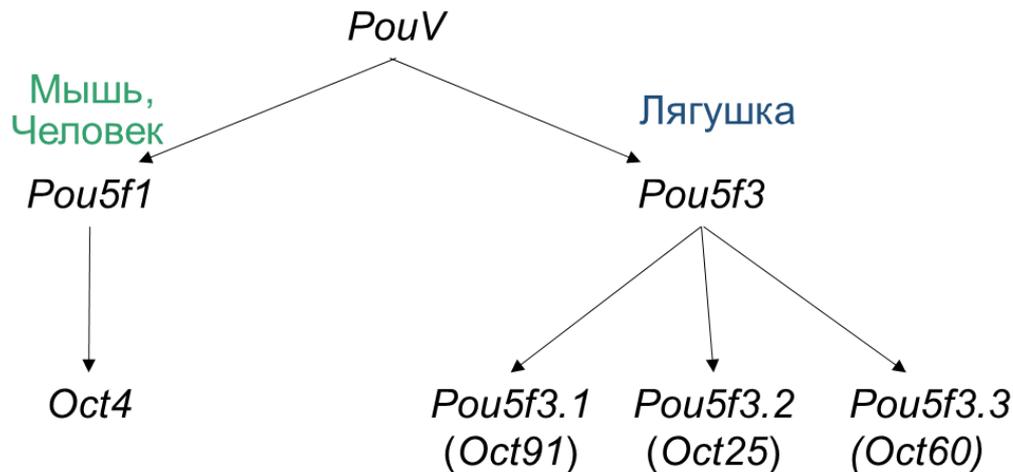


Рис. 4. Эволюционное древо генов *PouV*. Гены *pou5f3* лягушки паралогичны *Oct4* млекопитающих.

Существование двух паралогов *PouV* (*pou5f1* и *pou5f3*) ставит вопрос об их функциональной эквивалентности. Этот вопрос был частично рассмотрен методом межвидового “rescue” у лягушек, рыбок *Danio* и мышей. *Oct4* мыши может функционально заменить *Pou5f3* у *Xenopus* и *Danio* (Cao et al., 2006, Morrison and Brickman, 2006, Onichtchouk et al., 2010), это подтверждает представление о консервативных функциях генов *PouV*. Члены семейства *PouV* от разных позвоночных восстанавливают плюрипотентность в ES-клетках мыши, лишенных *Oct4* с разной эффективностью: *Xenopus Pou5f3.1* (*Oct91*) поддерживает плюрипотентность в ES-клетках мыши, лишенных *Oct4*, с той же эффективностью, что и собственный *Oct4*, в то время как эффективность *Pou5f3*

Danio очень низкая (Morrison and Brickman, 2006; Niwa et al., 2008). Гомологи Oct4 мыши обладают различной эффективностью при перепрограммировании соматических клеток. Pou5f3 *Danio* не индуцирует плюрипотентность соматических клеток мыши из-за различной вторичной структуры линкера между двумя Pou доменами (Esch et al., 2013). Однако это отличие не является признаком всех ортологов Pou5f3: Pou5f3 медаки, шпорцевой лягушки и аксолотля могут эффективно перепрограммировать фибробласты мыши и человека (Taria et al., 2012).

2.2.3. Pou5f3 в развитии *Xenopus laevis* подавляют дифференцировку клеток

Транскрипты *pou5f3* находятся в анимальной части зародыша *X. laevis* (Cao et al., 2007). Pou5f3 участвуют во всех важных ранних событиях развития и регулируют различные процессы, включающие как контроль стволовых клеток, так и специфическую клеточную дифференцировку.

С одной стороны, белки Pou5f3, как и их гомолог у млекопитающих, поддерживают клетки в недифференцированном состоянии. Так, Pou5f3.2 вместе с BMP4 стимулирует транскрипцию генов *Xvent*, который является транскрипционным репрессором и препятствует терминальной дифференцировке клеток (Cao et al., 2004). Оверэкспрессия *pou5f3.3* подавляет действие Activin / Nodal, BMP и Wnt сигнальных путей в раннем эмбрионе (Cao et al., 2006), что свидетельствует о роли Pou5f3.3 в механизмах подавления дифференцировки клеток в раннем эмбриональном развитии.

В эмбрионах с подавленной трансляцией PouV наблюдается уменьшение экспрессии маркеров некоммутированных клеток (*Bmp4*, *Xvent2* и *Xbra*), напротив, наблюдается расширение области экспрессии маркеров организатора (*gooseoid*, *chordin* и *cerberus*) и передней энтодермы (*Mixer*, *Sox17a* и *endodermin*). Белки *Xenopus* PouV имеют способность поддерживать ES-клетки

мышь в недифференцированном состоянии, что может свидетельствовать об их роли во время эмбриогенеза в поддержании клеток в мультипотентном и некоммутированном состоянии до и во время гаструляции (Morrison and Brickman, 2006).

Pou5f3 подавляют дифференцировку в энтодермальном направлении. В *Xenopus* образование энтодермы увеличивается при нокауте всех генов *pou5f3* (Morrison and Brickman, 2006) или двойном нокауте *pou5f3.2* и *pou5f3.3*, тогда как избыточная экспрессия на вегетативном полюсе Pou5f3 подавляет образование мезэнтодермы у эмбрионов *Xenopus* (Cao et al., 2006). Влияние на мезодермальный зародышевый слой различается в зависимости от числа нокаутированных генов: в эмбрионах с тройным нокаутом экспрессия мезодермального маркера *Xbra* снижается (Morrison and Brickman, 2006), а двойной нокаут *pou5f3.2* и *pou5f3.3* приводит к расширению экспрессии *Xbra* на эктодермальные территории (Cao et al., 2006).

С другой стороны, белки Pou5f3 регулируют клеточную дифференцировку во время гаструляции. Транскрипты *pou5f3* находятся в анимальной части зародыша *X. laevis*. Это является важным для начала гаструляции, так как белки *Xenopus* Pou5f3 регулируют дорсо-вентральную мезэнтодермальную дифференцировку несколькими путями. Они подавляют индукцию мезодермального зародышевого слоя через ингибирование активности VegT и β -катенинового сигналинга. Pou5f3, VegT и Tcf3 взаимодействуют друг с другом, образуя репрессирующий комплекс на промоторах целевых генов VegT и β -Catenin (рис.5) (Cao et al., 2007).

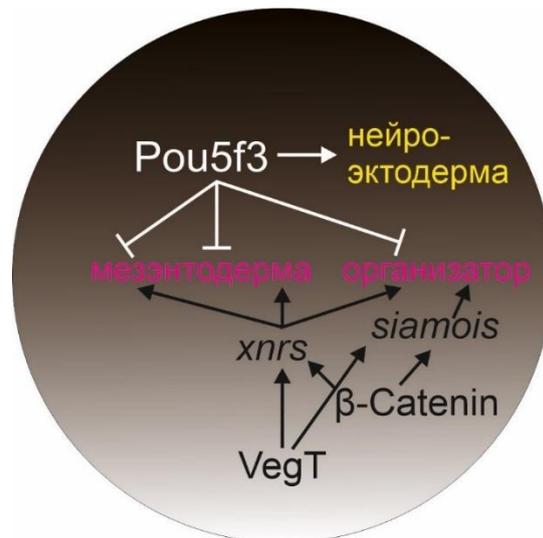


Рис. 5. Модель спецификации мезодермы у зародышей *Xenopus*. Pou5f3 факторы являются антагонистами VegT и β -Catenin, которые индуцируют и моделируют мезэнтодермальный слой зародыша (по Cao et al., 2007).

Сверхэкспрессия *rou5f3.2*, *rou5f3.3*, *rou5f3.1* или mOct4 ингибирует образование мезодермы во время эмбрионального развития *Xenopus*, блокируя активности активина A и Nodal-related белков.

Pou5f3.2 играет роль в образовании нервной ткани, по крайней мере частично, путем ингибирования BMP-опосредованной эпидермальной индукции. При сверхэкспрессии в эктодерме после стадии бластулы *Pou5f3.2* подавлял ранний ответ эктодермальных клеток на BMP и способствовал нейральной индукции при подавлении эпидермальной дифференцировки. Напротив, подавление трансляции *rou5f3.2* привело к расширению покровной эктодермы за счет нейральной эктодермы (Takebayashi-Suzuki et al., 2007).

Во время второй половины гаструляции, когда определена дифференцировка клеток в нейральном направлении в недифференцированной эктодерме, совместное действие путей Fgf, ретиноевой кислоты (RA) и Wnt / β -catenin индуцирует формирование задней части спинного мозга и задний мозг. Все три гена *rou5f3* выступают в роли антагонистов этих генных путей и подавляют постериоризацию нервной ткани. Транскрипционный фактор spalt-like 4 (*Sall4*), активируемый сигналами Fgf, подавляет экспрессию генов *rou5f3*,

что позволяет дополнительным сигналам Wnt / Fgf / RA постериоризовать нервную пластинку (Young et al., 2014).

Таким образом, белки класса Pou5f3 являются функциональными гомологами Oct4 млекопитающих и контролируют раннее эмбриональное развитие, определяя степень дифференцировки клеток.

В ходе данной работы, мы обратили особое внимание на один из генов этого семейства, наиболее близкий к Oct4 (Whitfield et al., 1993), - *pou5f3.3*, экспрессия которого жестко контролируется во время раннего развития на транскрипционном, посттранскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях. Белок Pou5f3.3 впервые обнаруживается в ооците на V стадии и быстро накапливается после оплодотворения, достигая пика во время МВТ. Во время гаструляции количество мРНК и белка быстро снижается (рис. 6) (Whitfield et al., 1995).

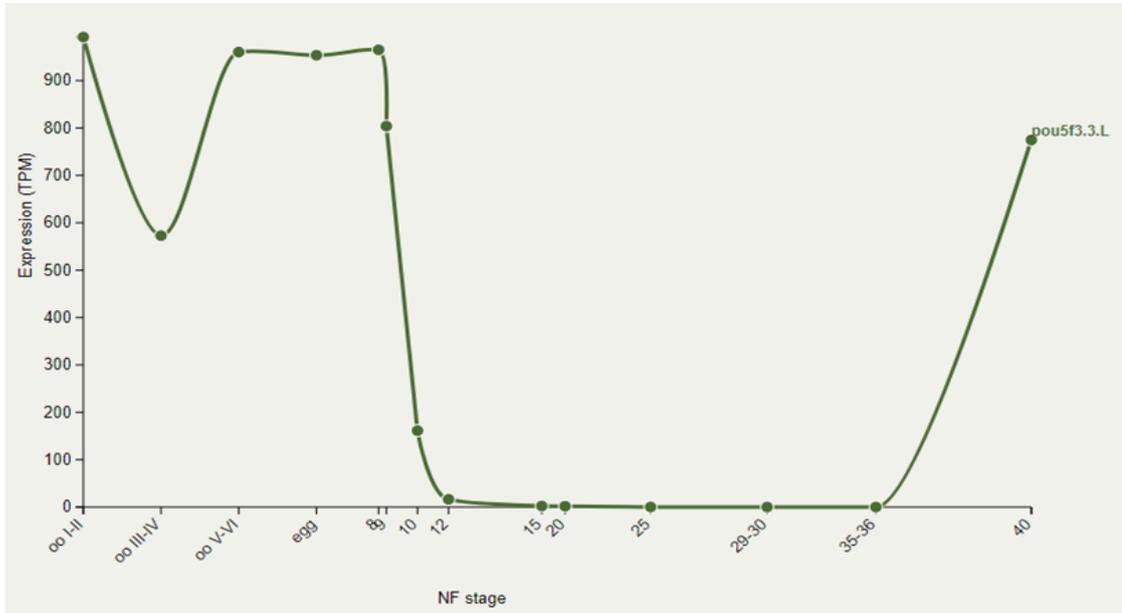


Рис. 6. Уровень экспрессии *pou5f3.3* во время оогенеза и эмбрионального развития *Xenopus laevis* (по Session et al. 2016).

Так как Pou5f3.3 играет роль в контроле ранних транскрипционных событий у эмбрионов *Xenopus* и от его присутствия зависит дифференцировка клеток, важную роль приобретают механизмы деградации транскриптов.

2.3. Эмбриональное развитие регулируется механизмами сохранения и деградации материнских мРНК

У большинства многоклеточных животных геном зародыша не активируется непосредственно после оплодотворения. В раннем эмбриогенезе материнские мРНК и белки регулируют развитие до активации зиготического генома (Bazzini et al., 2016). По меньшей мере, три механизма участвуют в замалчивании зиготического генома: хроматин-опосредованная репрессия, недостаток транскрипционных факторов и подавление транскрипции за счет укороченного клеточного цикла (Schier, 2007).

Во время перехода процесса развития под контроль зиготического генома транскриптом подвергается резкому ремоделированию, что приводит к удалению тысяч материнских мРНК. 3'UTRs (3'-untranslated region, 3'-Нетранслируемая область) регулируют стабильность мРНК в разных биологических процессах (Giraldez et al., 2006; Bushati et al., 2008; Lund et al., 2009). Так микроРНК miR-430 / -427 и miR-309 регулируют деградацию материнских мРНК у *Danio* (Giraldez et al, 2006), *Xenopus* (Lund et al, 2009) и *Drosophila* (Bushati et al, 2008). Аналогично, у *Drosophila*, РНК-связывающий белок SMAUG разрушает материнские мРНК (Tadros et al, 2007). Кроме того, большое значение имеет то, из каких кодонов состоит мРНК. Транскрипты с высокой долей неоптимальных кодонов менее стабильны, тогда как самые стабильные мРНК богаты оптимальными кодонами (Bazzini et al., 2016).

Наряду с механизмами деградации мРНК, в эмбрионах работают механизмы стабилизации материнских транскриптов. 3'poly-(A)-хвост в сочетании с поли-(A)-связывающим белком (РАВР) является наиболее изученным и охарактеризованным фактором устойчивости мРНК (Jacobson and Peltz, 1996). РАВР был идентифицирован как белок, тесно связанный с мРНК в частицах рибонуклеопротеинов (mRNP), вместе с белком Ybx1 (Evdokimova and Ovchinnikov, 1999). Активные полисомальные mRNPs обладают как Ybx1, так и

РАВР, однако, Ybx1 является преобладающим белковым компонентом mRNP (Evdokimova et al., 2001).

2.3.1. Строение и свойства Ybx1

Многофункциональный белок позвоночных Y-box binding protein 1 (Ybx1) относится к семейству белков с доменом холодового шока (CSD). Он участвует во многих клеточных процессах, в числе которых регуляция пролиферации и дифференцировки клеток (Eliseeva et al., 2011).

Белок Ybx1 был идентифицирован и описан в 1970-х годах, как ДНК-связывающий белок, взаимодействующий с так называемым мотивом Y-box (Y/ССААТ box) в промоторе генов основных классов гена гистосовместимости класса II (Tafuri and Wolffe, 1990). После этого, исследование Ybx1 продолжалось в двух параллельных направлениях: его роль в контроле биологии мРНК (сплайсинг, стабильность, трансляция), в котором он занял центральное положение (Evdokimova et al., 2006), и его роль в контроле инициации транскрипции, которая была более спорной (Dolfini and Mantovani, 2013).

Ybx1 состоит из трех доменов. N-концевой домен содержит большое количество аминокислотных остатков аланина и пролина. Домен холодового шока (CSD) имеет третичную структуру β -цилиндра. С-концевой домен (CTD) состоит из чередующихся кластеров кислых и основных аминокислот. CTD Ybx1 содержит сигнал ядерной локализации (NLS), сигнал удержания в цитоплазме (CRS) и сайт расщепления протеасомой 20S (рис. 7) (Lyabin et al., 2014). Все три домена Ybx1 вовлечены во взаимодействие с белками (Eliseeva et al., 2011).

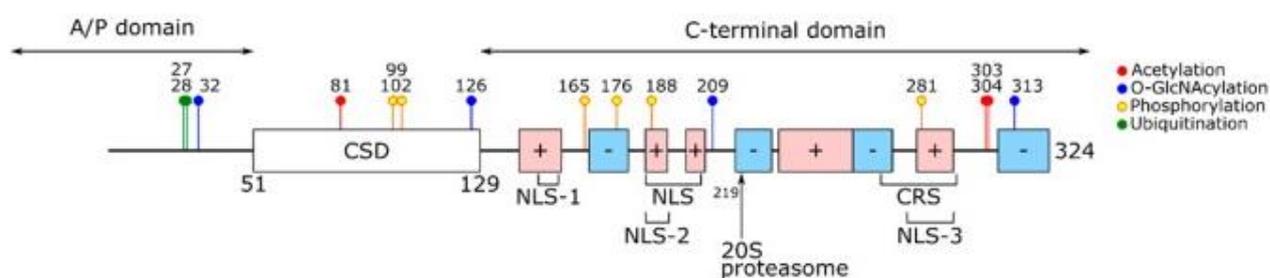


Рис. 7. Доменная организация Ybx1. А / Р домен - богатый аланином / пролином домен; CSD - домен холодного шока; NLS - сигнал ядерной локализации; CRS - сигнал удержания в цитоплазме. Кластеры положительно и отрицательно заряженных аминокислот показаны красным и синим цветом соответственно. Указаны модификации белка (по Mordovkina et al., 2020).

Ybx1 - ДНК- и РНК-связывающий белок, но также он взаимодействует с белками. Связываясь с нуклеиновыми кислотами, Ybx1 участвует во многих ДНК- и мРНК-зависимых процессах: репликации и репарации ДНК, сплайсинге пре-мРНК, стабилизации и трансляции мРНК. Таким образом, Ybx1 осуществляет глобальную и специфическую регуляцию генной экспрессии на разных уровнях (Eliseeva et al., 2011).

Белок Ybx1 выполняет свои функции как в цитоплазме, так и в ядре клетки (Dolfini and Mantovani, 2013). Его субклеточная локализация определяется сигналом ядерной локализации (NLS, 186–205 а.о.) и сигналом удержания в цитоплазме (CRS, 267–293 а.о.) (Jurchott et al., 2003). Считается, что CRS преобладает над NLS и вызывает в основном цитоплазматическую локализацию Ybx1. Протеасома 20S отщепляет С-концевую часть Ybx1 (220–324 а.о.), тем самым запуская накопление усеченного белка в ядре (Sorokin et al., 2005). Наиболее изученной модификацией Ybx1 является его фосфорилирование по Ser102 с помощью Akt или RSK (Sutherland et al., 2005; Stratford et al., 2008), которое способствует накоплению Ybx1 в ядре (Mo et al., 2016).

Об экспорте из ядра Ybx1 почти ничего не известно. Возможно, Ybx1 связывает мРНК сразу после транскрипции или ко-транскрипционно, и его транслокация в цитоплазму происходит вместе с мРНК и опосредуется белками экспорта РНК. Эта гипотеза косвенно подтверждается двумя фактами: быстрым

экспортом Ybx1 после прекращения блокады транскрипции (Kretov et al., 2019) и ассоциацией Ybx1 с хроматином (Finkbeiner et al., 2009), предполагающими ко-транскрипционное связывание Ybx1 с формирующейся РНК.

Он также может быть секретирован из клеток, и путем связывания с рецепторами на их поверхности он может осуществлять межклеточный сигналинг (Eliseeva et al., 2011).

2.3.2. Взаимодействие Ybx1 с РНК

Ybx1 - один из немногих белков, связывающийся с большей частью мРНК и присутствующий на них в большом количестве. Количество белка, связанного с каждой конкретной мРНК, определяется ее длиной и трансляционным статусом (Eliseeva et al., 2011).

Сайты связывания на разных типах нуклеиновых кислот у Ybx1 различны: GGGG (на однонитевой ДНК), CACC/T (ДНК) и AACAUС (РНК). Ни один из них не напоминает канонический Y/CCAAT box. Ybx1 предпочитает связываться с РНК и одноцепочечной ДНК (Dolfini and Mantovani, 2013).

Известно, что Ybx1 неспецифически связывается с широким спектром последовательностей. При связывании с гомополирибонуклеотидами, Ybx1 имеет самое высокое сродство к поли (G) и постепенно уменьшающееся сродство к поли (U), поли (A) и поли (C) (Minich and Ovchinnikov, 1992). Конкретная последовательность, с которой предпочитает связываться Ybx1 X. laevis - гексануклеотидная последовательность 5' AACAUС 3', называемая YRS (FRGY recognized sequence). Как показано точечным мутагенезом, С в третьей позиции, А в четвертой и С в шестой являются нуклеотидами, определяющими более высокое сродство Ybx1 (Bouvet et al., 1995).

Интересно, что Ybx1 имеет более высокое сродство к РНК, в состав которой входит 8-оксогуанин. Такая модификация может быть следствием

окислительного стресса и может приводить к ошибкам трансляции. Считается, что, распознав мРНК, Ybx1 способна блокировать ее трансляцию (Hayakawa et al., 2002).

Считается, что CTD отвечает за неспецифическое связывание РНК, хотя, согласно некоторым данным, он предпочитает пиримидиновые основания. В целом, CTD обеспечивает высокое сродство Ybx1 к нуклеиновым кислотам. CSD обеспечивает специфическое связывание с РНК, в то время как CTD и, возможно, А / Р-домен усиливает и стабилизирует эти взаимодействия (Bouvet et al., 1995).

При низком соотношении Ybx1 / мРНК, которое свойственно полисомным mRNP, мономер Ybx1 связывается с мРНК двумя доменами CSD и CTD. В следствие этого mRNP разворачиваются, и их мРНК становится доступной для трансляции. При высоком соотношении Ybx1 / мРНК, свойственном свободным нетранслируемым mRNP, молекулы Ybx1 взаимодействуют с мРНК только CSD, в то время как CTD взаимодействуют между собой, в результате образуются мультимерные комплексы Ybx1, в которых концы мРНК, оказываются недоступными для факторов инициации трансляции и рибосом (Skabkin et al., 2004). Таким образом, Ybx1 может регулировать трансляцию и время жизни мРНК в клетке за счет разных способов упаковки mRNP (Eliseeva et al., 2011).

Существует ряд предположений, объясняющих положительное влияние Ybx1 на трансляцию. Во-первых, Ybx1 может препятствовать неспецифическому связыванию факторов инициации трансляции (Minich and Ovchinnikov, 1992). Во-вторых, Ybx1 способен расплавлять вторичную структуру мРНК, что может помогать перемещению малой субъединицы рибосомы вдоль 5'-UTR мРНК к стартовому кодону (Eliseeva et al., 2011).

Ybx1 способен влиять на кэп-независимую трансляцию, включая трансляцию, зависящую от внутренней стыковки рибосомы с особым сайтом мРНК, обогащенным вторичной структурой, называемой IRES (участок внутренней посадки рибосомы). Установлено, что Ybx1 положительно

регулирует трансляцию IRES-содержащих мРНК протоонкогенов тус-семейства. Также Ybx1 участвует в регуляции трансляции мРНК, ответственных за ЭМП. Например, мРНК *Snail1* имеет высокоструктурированный 5'-UTR, и инициация ее трансляции протекает с помощью сар-независимого механизма при более высоких концентрациях Ybx1, чем оптимальные для сар-зависимой трансляции большинства клеточных мРНК (Evdokimova et al., 2009).

Ybx1 способен эффективно стабилизировать мРНК, предотвращая ее деградацию. В этом процессе ключевую роль играет CSD. При большом соотношении Ybx1 / мРНК достигается максимальная стабилизация мРНК. Это происходит из-за высвобождения мРНК из полисом и прекращения их трансляции. Стабилизация мРНК, вызванная действием Ybx1, протекает с помощью универсального механизма, не зависящего от дестабилизирующих AU-богатых элементов (AU-rich elements, AREs) в 3'-UTR мРНК, но в зависимости от отношения Ybx1 / РНК (Bader et al., 2003). Также Ybx1 узнает специфические последовательности в некоторых мРНК (*GM-CSF*, *VEGF*), и в комплексе с другими белками стабилизирует их (Eliseeva et al., 2011).

2.3.3. Взаимодействие Ybx1 с белками

Ybx1 взаимодействует с широким спектром белков: транскрипционными факторами, РНК-связывающими белками вирусными белками и актиновыми филаментами (Kohn et al., 2003).

Во взаимодействие с белками вовлечены все три домена Ybx1 (рис. 8) (Eliseeva et al., 2011).

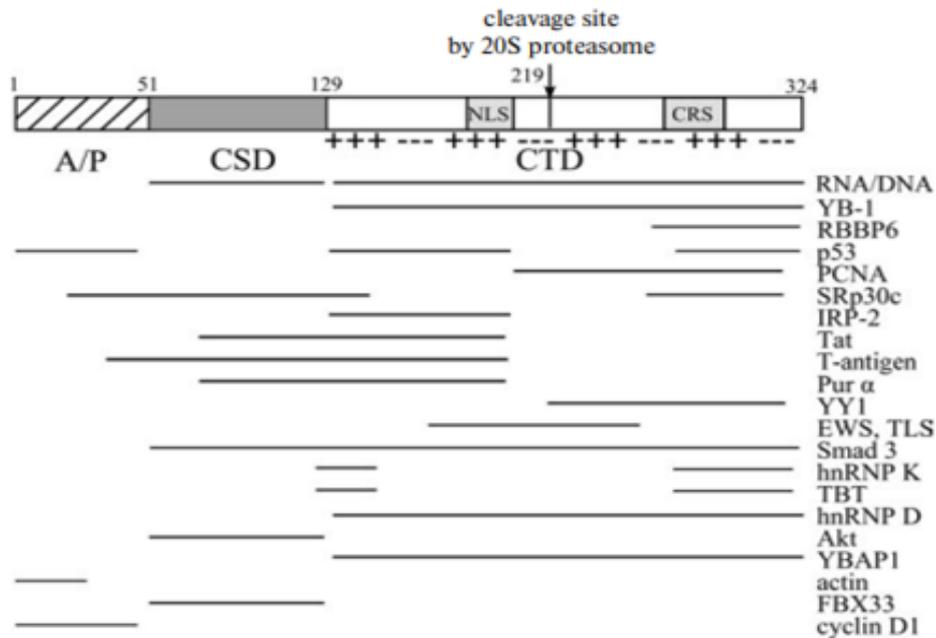


Рис. 8. Схема сайтов связывания для партнеров Ybx1. Полосы обозначают участки, которыми Ybx1 взаимодействует с белками (по Eliseeva et al., 2011).

Ybx1 непосредственно взаимодействует с транскрипционным фактором супрессором опухолей p53, и это взаимодействие взаимно модулирует функцию связывания ДНК каждого белка. Взаимодействие p53 и Ybx1 также модулирует экспрессию генов человека, содержащих сайты связывания p53 или Ybx1 (Okamoto et al., 2000).

Связывание Ybx1 с актиновыми микрофиламентами играет важную роль в локализации синтеза белка. Микрофиламенты, по-видимому, наиболее важны для локализации синтеза белка как при эмбриональном развитии, так и в соматических клетках, тогда как микротрубочки и промежуточные филаменты могут функционировать в основном для перемещения или закоривания мРНК (Ruzanov et al., 1999).

2.3.4. Ybx1 - маркер клеточных перерождений

Анализ профилей транскриптомов при различных типах клеточных перерождений (рак груди, толстой кишки, щитовидной железы, простаты и

лейкемии) идентифицировал сверхэкспрессию генов, содержащих Y/ССААТ box в промоторной области. Это указывает на то, что Y / ССААТ имеет важное значение для сверхэкспрессии раковых генов в опухолях. Поэтому транскрипционные факторы, распознающие этот элемент, вероятно, имеют отношение к процессу клеточных преобразований. (Dolfini and Mantovani, 2013).

Ybx1 играет проонкогенную роль в ДНК-репарации, клеточной пролиферации, лекарственной устойчивости, инвазии опухоли и метастазировании через регулирование нескольких генных путей. Недавние исследования показали, что Ybx1 способствует ЭМП через повышение экспрессии Snail1 (Guo et al, 2017).

Учитывая множество онкогенных эффектов, которые может оказывать Ybx1, а также тот факт, что он сверхэкспрессируется во многих различных злокачественных новообразованиях человека, этот белок является очень привлекательной потенциальной мишенью для опухолевой терапии. Однако развитие направленной терапии против такой универсальной молекулы очень сложно (Kosnopfel et al., 2014).

2.3.5. Ybx1 играет важную роль в позднем эмбриогенезе

Нокаут гена Ybx1 у мышей приводит к серьезным нарушениям эмбрионального развития, а также к пренатальной смерти. Высокое содержание Ybx1 характерно для всех органов мыши, как на дородовых, так и ранних постнатальных стадиях развития. Однако количество этого белка постепенно уменьшается со старением, а в старости оно практически не встречается ни в одном органе, кроме печени (Eliseeva et al., 2011).

Эксперименты с нокаутированием гена Ybx1 у эмбрионов крыс показали важную роль Ybx1 в позднем эмбриогенезе. Мутантные эмбрионы Ybx1 - / - нормально развивались до 13,5 дней (E13.5), после чего их рост резко замедлялся

и наблюдались аномалии в формировании нервной трубки. Если животные с таким генотипом все же рождались, они были нежизнеспособны и быстро погибали. Можно было ожидать, что нокаут гена *Ybx1*, который участвует в таких жизненно важных клеточных процессах, как транскрипция и трансляция, должен привести к серьезным нарушениям в функционировании клеток. Однако при анализе фибробластов полученных из *Ybx1* - / - эмбрионов на стадии E13.5, никаких заметных изменений в транскрипции и трансляции не выявлено. Такие фибробласты обладают только повышенной чувствительностью к различным типам стресса (окислительным и генотоксическим стрессам) и сниженной способностью расти и делиться (Lu et al., 2005). В связи с этим интересно, что культивируемая линия клеток цыплят DT40 с нокаутом по гену *ubx1* (*ubx1* - / -) не отличается от контрольных клеток в оптимальных условиях роста, но их деление полностью прекращается при неоптимальной температуре (Matsumoto et al., 2005)

Интересно также и обстоятельство, связанное с воздействием нокаута гена *ubx1* на формирование нервной трубки. Ключевым этапом в этом процессе является ЭМП. Этот переход сопровождается повышенной подвижностью клеток и миграцией, необходимой для успешного формирования нервной трубки. Поскольку было установлено, что избыточная экспрессия *Ybx1* в Ras-трансформированных клетках вызывает ЭМП, можно предположить, что нарушения в образовании нервной трубки при нокауте *ubx1* связаны с участием *Ybx1* в ЭМП. Это предположение также косвенно подтверждается тем фактом, что другой ключевой участник процесса ЭМП, Twist, является регулятором транскрипции экспрессии гена *Ybx1* (Shiota et al., 2008).

В нашей лаборатории ранее было показано, что *Ybx1* взаимодействует с Zuxin в системе двугибридного дрожжевого скрининга. Поскольку оба этих белка принимают участие в ЭМП, который происходит в том числе при метастазировании опухолей, которому предшествует дедифференцировка

клеток. Нами был поставлен вопрос о влиянии Zyxin и Ybx1 на экспрессию генов плюрипотентности семейства *pou5f3*

Таким образом, на данный момент довольно много известно о роли цитоскелетного белка Zyxin в организации актинового цитоскелета и стабилизации клеточных контактов. Хорошо изучено его участие в ЭМП, который происходит и в нормальном эмбриональном развитии, и при метастазировании опухолей. Известно, что на количество белка Zyxin оказывает влияние степень дифференцированности клеток. Однако вопрос о влиянии Zyxin и его отсутствия на клеточную дифференцировку остается открытым. В данной работе мы рассмотрели вопрос о механизмах регуляции экспрессии генов плюрипотентности семейства *pou5f3* белком Zyxin.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Материалы

3.1.1. Реактивы и оборудование

В таблице указаны реагенты и оборудование, которые были использованы в работе

Таблица 1. Реагенты и оборудование, использованные в работе

РЕАГЕНТЫ	Источник
Антитела	
Rabbit polyclonal anti-Zyxin	A.G. Zraisky lab
Rabbit polyclonal anti- Pou5f3.3	A.G. Zraisky lab
Mouse monoclonal anti-c-Мyc, AP-conjugated	Sigma-Aldrich
Mouse monoclonal anti-Flag [®] M2, AP-conjugated	Sigma-Aldrich
Anti-rabbit IgG, AP-conjugated, produced in goat	Sigma-Aldrich
Mouse monoclonal anti-alpha-Tubulin	Sigma-Aldrich
Anti-mouse IgG, AP-conjugated	Sigma-Aldrich
Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments	Roche
EZview Red Anti-c-Мyc Affinity Gel	Sigma-Aldrich
EZview Red ANTI-FLAG M2 Affinity Gel	Sigma-Aldrich
Бактериальный штаммы	
DH5alpha <i>E.coli</i>	
BL21 <i>E.coli</i>	
Химические вещества, пептиды и рекомбинантные белки	
Human chorionic gonadotropin	Sigma-Aldrich
Рестриктазы: NotI, XhoI, HindIII, EcoRI, NcoI, BamHI, Eco147I, Bstv2I	Fermentas
T4 DNA ligase	Fermentas
Western Blue [®] stabilized substrate for alkaline phosphatase	Promega
Хлорид натрия (NaCl)	Helicon
Хлорид калия (KCl)	Helicon
Дигидрат хлорида кальция (CaCl ₂ *2H ₂ O)	Amresco
Сульфат магния (MgSO ₄)	Helicon
Гексагидрат хлорида магния (MgCl ₂ *6H ₂ O)	Panreac
Гептагидрат гидрофосфата натрия (Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O)	Helicon
Дигидрат дигидрофосфата натрия (NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O)	Ferak

Дигидрофосфат калия (KH ₂ PO ₄)	Ferak
Малеиновая кислота	MERCK
MOPS	Helicon
HEPES	Panreac
L-цистеин	Dia-m
Фиколл	Dia-m
Гидроксид натрия (NaOH)	Dia-m
Агароза	Helicon
Этанол	Флора Кавказа
Метанол	
Триэтаноламин хлорид	Sigma-Aldrich
Ацетангидрид	
Формаид	BRL
TotulaRNA	Sigma-Aldrich
CHAPS	
Поливинилпирролидон	Sigma-Aldrich
Бычий сывороточный альбумин	Sigma-Aldrich
DIG RNA Labeling Mix	Sigma-Aldrich
Boehringer Mannheim Purple (BMP)	Roche
Blocking Реагент	Roche
Lamb serum	Invitrogen
Levamisole	Sigma-Aldrich
NP-40	Sigma-Aldrich
DTT	Fermentas
RNase Out RNase inhibitor, 100 units/ml	Invitrogen
Vanadyl ribonucleoside complexes (VRC)	New England Biolabs
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
PMSF	Sigma-Aldrich
Бромистый этидий	Helicon
1 kb DNA Ladder	Евроген
100+ bp DNA Ladder	Евроген
Хлороформ	Химмед

Tris	Helicon
EDTA	Helicon
Ледяная уксусная кислота (ЛУК)	Panreac
EGTA	Helicon
Параформальдегид	Sigma-Aldrich
Глицерин	Helicon
Сахароза	Sigma-Aldrich
Додецил сульфат натрия (SDS)	Sigma-Aldrich
Глицин	Helicon
Акриламид 2К	Helicon
Бис-акриламид	Helicon
Пероксодисульфат аммония ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₆ (O ₂))	Merck
Протеиназа К, recombinant, PCR Grade	Roche
Fluorescein Lysine Dextran (FLD) 40 kD	Invitrogen
Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt	Sigma-Aldrich
Tween 20	Helicon
2-Мерcapтоethanol	Sigma-Aldrich
Синтетический пептид соответствующий 125-136 а.а. белка Pou5f3.3	A.G. Zaraisky lab.
Glutathione-Agarose	Sigma-Aldrich
BM Purple AP-substrate	Roche
3xMYC peptide	Sigma
Brilliant Blue G solution	Sigma-Aldrich
Циклогексимид	Sigma-Aldrich
CNBr-Activated Sepharose™ 4B	GE Healthcare
Активин А	
Актиномицин D	
Ампициллин	
LB (Luria-Bertani) liquid medium	
Vacto agar	
Коммерческие наборы	
mMessage mMachine™ SP6kit	Invitrogen
ExtractRNA	Евроген
CleanRNA Standard	Евроген

Tersus Plus PCR kit	Евроген
Encyclo Plus PCR kit	Евроген
MMLV RT	Евроген
qPCRMix-HS SYBR	Евроген
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega
Nano-Glo Luciferase Assay System	Promega
Dynabeads mRNA DIRECT Kit	Ambion
NEBNext RNA Library Prep Kit for Illumina	NEB
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ	
<i>Xenopus laevis</i> frogs	Nasco
HEK293	
<i>Danio rerio</i> AB/TL strain	
ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ	
Excel	Microsoft
ImageJ	https://imagej.nih.gov/ij/
TopHat2	https://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml
Tool for selecting target sites for CRISPR/Cas9	https://www.genscript.com/gRNA-detail/7791/ZYX-CRISPR-guide-RNA.html
ОБОРУДОВАНИЕ	
Шприц на 2 мл с иглой 23Gx1¼”	Medical Products
Миницентрифуга-вортекс Microspin	BioSan
Льдогенератор	Porkka
Хирургические ножницы	
Пинцеты	
Микроцентрифуга	Eppendorf
Термостат "Гном"	ДНК-Технология
Микроцентрифуга MiniSpin	Eppendorf
Настольная центрифуга с охлаждением 5415R	Eppendorf
Напольная центрифуга с охлаждением GR412	Jouan
Нанофотометр Implen	Implen

Микропипетки автоматические	Gilson
Нутатор	Clay Adams
Люминометр TD-20/20	Turner Designs
Источник питания для электрофореза	Amercham Pharmacia Biotech
Hoefel Mighty Small Dual Mini Gel Caster	Hoefel
Аппарат для электрофореза Hoefel Mighty Small II Mini Vertical Electrophoresis System	Hoefel
Прибор для полусухого переноса Amersham ECL Semi-Dry Blotters	Amercham Biosciences
Микроинъектор FemtoJet	Eppendorf
Стереомикроскоп	Leica
Микроскоп Zeiss Axiovert 200M	Zeiss
Leica Modular Systems	Leica
Амплификатор Real-time ДТпрайм	ДНК-Технология
Термостатируемая качалка	Scello
Шейкер с термостатируемой камерой C26	Edison
Система очистки воды	Milli-Q Water Purification system
Весы аналитические	Ohaus
pH-метр OP-211/2	Radelkis OP-211/2
Термостат	TC-80M-2
Чашки Петри	Greiner
Плашки Теразаки	Greiner
Серологические пипетки	Greiner
Пробирки микроцентрифужные	SSI
Наконечники для пипеток	SSI
Пробирки в стрипах	SSI

3.1.2. Буферы, растворы, среды

В работе использовали следующие буферы и растворы:

Растворы, использованные для получения эмбрионов

20x MMR

Реагент	Конечная концентрация	Количество
NaCl	2 М	58,45 г
KCl	0,04 М	1,43 г
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,04 М	2,94 г
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,02 М	2,03 г
Milli-Q water	До конечного объема 500 мл	
Итого	n/a	500мл

200x Hepes

Реагент	Конечная концентрация	Количество
Hepes	1 М	119,1 г
Milli-Q water	До конечного объема 500 мл	
Итого	1 М	500 мл
Довести pH до 7,4 с помощью NaOH		

1x MMR

Реагент	Конечная концентрация	Количество
20x MMR	N/A	5 мл
200x Hepes	5 mM	0,5 мл
ddH ₂ O	До конечного объема 100 мл	
Итого	n/a	100 мл

0,1x MMR

Реагент	Конечная концентрация	Количество
20x MMR	N/A	5 мл
200x Hepes	5 mM	5 мл
ddH ₂ O	До конечного объема 1000 мл	
Итого	n/a	1000мл

L-цистеин

Реагент	Конечная концентрация	Количество
L-цистеин	2 % (w/v)	2 г
0,1x MMR	До конечного объема 100 мл	
Итог	n/a	100 мл
Довести pH до 7,8 с помощью NaOH		

Фиколл

Реагент	Конечная концентрация	Количество
Ficoll	4% (w/v)	4 г
0,1x MMR	До конечного объема 100 мл	
Итог	n/a	100 мл

Растворы, использованные для микроинъекций**FLD**

Реагент	Конечная концентрация	Количество
Fluorescein Lysine	50 µg/мкл	25 мг
Dextran		
Milli-Q water	До конечного объема 500 мкл	
Итог	50 µg/мкл	500 мкл

Растворы, используемые для гибридизации *in situ***MEMFA**

Реагент	Конечная концентрация	Количество
paraformaldehyde	3,7%	7,44 г
EGTA (0,5 M)	2 mM	800 мкл
MgSO ₄ (1M)	1 mM	200 мкл
MOPS (1 M, pH 7.4)	1 mM	20 мл

Milli-Q water	До конечного объема 200 мл	
Итого	n/a	200 мл

20x PBS

Реагент	Конечная концентрация	Количество
NaCl	120 mM	70,1 г
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	7mM	18,77 г
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	3 mM	4,7 г
KCl	2,7 mM	2 г
Milli-Q water	До конечного объема 500 мл	
Итого	n/a	500 мл

1x PTW

Реагент	Конечная концентрация	Количество
1x PBS	N/A	500 мл
Tween 20	0,1 %	500 мкл
Итого	n/a	500 мл

20x SSC

Реагент	Конечная концентрация	Количество
NaCl	3 M	8,75 г
NaCitrate*2H ₂ O	300 mM	5 г
Milli-Q water	До конечного объема 50 мл	
Итого	n/a	50 мл

Denhardt's solution

Реагент	Конечная концентрация	Количество
Бычий сывороточный альбумин	1 %	5 г
Ficoll	1 %	5 г
Поливинилпирролидон	1 %	5 г
Milli-Q water	До конечного объема 50 мл	
Итого	n/a	50 мл

РН-буфер

Реагент	Конечная концентрация	Количество
Формаид	50 %	25 мл
20x SSC	5x	12,5 мл
Torula RNA	1 мг/мл	1 мл
50x Denhardt's solution	1x	1 мл
Tween 20	0,1 %	50 мкл
10% Chaps	0,1 %	500 мкл
ЭДТА (0,5 М)	10 mM	1 мл
Milli-Q water	До конечного объема 50 мл	
Итого	n/a	50 мл

МАВ

Реагент	Конечная концентрация	Количество
Малеиновая кислота	100 mM	5,9 г
NaCl	150 mM	4,35 г

Milli-Q water	До конечного объема 500 мл	
Итого	n/a	500 мл
Довести pH до 7,5 с помощью NaOH		

AP-буфер

Реагент	Конечная концентрация	Количество
Tris-HCl (1 M, pH 9.5)	100 mM	5 мл
MgCl ₂ (2 M)	50 mM	1,25 мл
NaCl (5 M)	100 mM	1 мл
Tween 20	0,1 %	50 мкл
Levamisole (500 mM)	2 mM	200 мкл
Milli-Q water	До конечного объема 50 мл	
Итого	n/a	50 мл

Буфер для электрофоретического разделения нуклиновых кислот

50x TAE

Реагент	Конечная концентрация	Количество
Tris	2 M	48,4 г
ЭДТА	60 mM	3,72 г
ЛУК	5,7 % (v/v)	11,4 мл
Milli-Q water	До конечного объема 200 мл	
Итого	n/a	200 мл
Довести pH до 8,0 с помощью ЛУК		

Буферы для исследования белок-белковых взаимодействий**1x Co-IP buffer**

Реагент	Конечная концентрация	Количество
NaCl	137 mM	0,794 г
KCl	2,7 mM	0,2 г
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	8,1 mM	0,217 г
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	0,02 г
Triton-X100	1 %	1 мл
Milli-Q water	До конечного объема 100 мл	
Итого	n/a	100 мл

1x Pulldown buffer (PDB)

Реагент	Конечная концентрация	Количество
Tris-HCl (1 M, pH 7,5)	25 mM	250 мкл
NaCl (5 M)	175 mM	350 мкл
EDTA (0,5 M)	1 mM	20 мкл
EGTA (0,5 M)	1 mM	20 мкл
Глицерин	5 %	500 мкл
Nonidet P-40	0,5 %	50 мкл
Protease Inhibitor Cocktail	1%	100 мкл
Milli-Q water	До конечного объема 10 мл	
Итого	n/a	10 мл

Буферы, используемые для РНК-иммунопреципитации**Polysome lysis buffer**

Реагент	Конечная концентрация	Количество
KCl (1 M)	100 mM	100 мкл
MgCl ₂ (2 M)	5 mM	2,5 мкл
200x Hepes	10 mM	10 мкл
Nonidet P-40	0,5% (v/v)	5 мкл
DTT (1 M)	1 mM	10 мкл
RNAse Out	100 U/мл	2,5 мкл
VRC (200 mM)	400 μM	2 мкл
Protease Inhibitor Cocktail	4% (v/v)	200 мкл
Milli-Q water	n/a	668 мкл
Итого	n/a	1 мл

NT2 buffer

Реагент	Конечная концентрация	Количество
Tris-HCl (1M, pH 7.4)	50 mM	2,5 мл
NaCl (5 M)	150 mM	1,5 мл
MgCl ₂ (2 M)	1 mM	25 мкл
Nonidet P-40	0,05 % (v/v)	25 мкл
Milli-Q water	До конечного объема 50 мл	
Итого	n/a	50 мл

Буферы, используемые для разделения ядерной и цитоплазматической фракций

Buffer N

Реагент	Конечная концентрация	Количество
200x Neres	20 mM	20 мкл
Сахароза	2% (w/v)	0,02 г
KCl (1 M)	10 mM	10 мкл
MgCl ₂ (2 M)	1,5 mM	3 мкл
EDTA (0,5 M)	0,2 mM	0,4 мкл
DTT (1 M)	0,5 mM	0,5 мкл
Protease Inhibitor Cocktail	2% (v/v)	20 мкл
Milli-Q water	To a final volume of 1 мл	
Итого	n/a	1 мл

Buffer E

Реагент	Конечная концентрация	Количество
200x Neres	20 mM	20 мкл
Сахароза	2% (w/v)	0,02 г
KCl (1 M)	150 mM	150 мкл
MgCl ₂ (2 M)	1,5 mM	3 мкл
EDTA (0,5 M)	0,2 mM	0,4 мкл
DTT (1 M)	0,5 mM	0,5 мкл
Protease Inhibitor Cocktail	2% (v/v)	20 мкл
Nonidet P-40	0,5% (v/v)	5 мкл

Milli-Q water	To a final volume of 1 мл	
Итого	n/a	1 мл

Буферы, используемые для электрофоретического разделения белков

4x Laemmli buffer

Реагент	Конечная концентрация	Количество
Глицерин	10% (v/v)	1 мл
Tris-HCl (1M, pH 6.5)	125 mM	1,25 мл
SDS	8% (w/v)	0,8 г
2-Mercaptoethanol	5 % (v/v)	500 мкл
Milli-Q water	До конечного объема 10 мл	
Итого	n/a	10 мл

10X Running buffer

Реагент	Конечная концентрация	Количество
Tris	250 mM	30 г
Глицин	1,92 M	144 г
SDS	1%	10 г
Milli-Q water	До конечного объема 1000 мл	
Итого	n/a	1000 мл

Transfer buffer

Реагент	Конечная концентрация	Количество
Tris-HCl (1M, pH 7.6)	25 mM	2,5 мл

Глицин	192 mM	1,44 г
Метанол	20 %	20 мл
SDS	0,03 % (w/v)	30 мг
Milli-Q water	До конечного объема 100 мл	
Итого	n/a	100мл

3.2. Методы

3.2.1. Манипуляции с эмбрионами *Xenopus laevis* и *Danio rerio*

Эмбрионы *Xenopus laevis* получали и микроинъектировали, как описано ранее (Martynova et al., 2021).

Danio rerio выращивали в среде E3 (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄, уравновешенный до pH 7,0) при 26,5 ° C. Морфолино вводили в желток только что отложенных яиц, помещенных на 1% (мас. / Об.) агарозную подложку, и культивировали до желаемой стадии, определенной в соответствии с таблицей нормального развития (Westerfield, 2000).

Таблица 2. Морфолиновые нуклеотиды, использованные в работе

Название	Описание и последовательность морфолиновых нуклеотидов
<i>anti-zuxin X MO1</i>	МО к позиции +32–+57 мРНК <i>zuxin</i> двух псевдоаллелей <i>zuxin Xenopus laevis</i> : TGAAATGTTGATGGTGAAGGAGGAC
<i>anti-zuxin X MO2</i>	МО к позиции 0–+25 мРНК <i>zuxin</i> двух псевдоаллелей <i>zuxin Xenopus laevis</i> : GGGTGGCAGGAGCCGCTGGGTCCAT
<i>anti-zuxin splice X MO</i>	МО к позиции +953–+972 мРНК <i>zuxin</i> двух псевдоаллелей <i>zuxin Xenopus laevis</i> : ctcccaactactcacaactcaCCTGATG (intron) (exon)
<i>контрольные МО</i>	МО к мРНК <i>zuxin Xenopus laevis</i> с ошибками ТТААСТГТТТААТГТТГААТГАГААС
<i>anti-zuxin Danio MO1</i>	МО к позиции -23–+3 мРНК <i>zuxin Danio rerio</i> : CATCTTGATTGTTCGTTTTCTTCGT

<i>anti-ybx1</i> МО	МО к позиции -12-+13 мРНК <i>ybx1</i> двух псевдоаллелей <i>ybx1</i> <i>Xenopus laevis</i> : cctcgctgctcattgtgtctttgat
---------------------	--

3.2.2. Высокопроизводительное секвенирование

Эксплантаты нейроэктодермы на стадии ранней нейрулы (стадия 14) вырезали из эмбрионов *Xenopus laevis*, инъецированных либо *anti-zuxin* МО, либо контрольными МО, и лизировали для выделения РНК. Для каждого типа образца таким образом готовили три повтора, каждая из которых содержала РНК из 10 эксплантов одного и того же типа. Качество РНК проверяли в BioAnalyser и RNA 6000 Nano Kit (Agilent). Фракции полиА-РНК очищали с помощью набора для очистки мРНК Dynabeads® (Ambion). Библиотеки Illumina были приготовлены с помощью набора NEBNext® RNA Library Prep Kit для Illumina® (NEB) в соответствии с рекомендациями производителя. Секвенирование выполняли на аппарате Illumina HiSeq1500 с односторонними ридами 50 п.н. Для каждого образца было произведено не менее 10 миллионов считываний.

Отображение чтения было выполнено с помощью программы tophat2 v.2.0.9. В качестве эталонного генома мы использовали *Xenopus Laevis* build 6 (<http://www.xenbase.org/genomes/static/laevis.jsp>). Для анализа дифференциальной экспрессии генов мы использовали Cufflinks v2.1.1.

3.2.3. Выделение тотальной РНК и синтез кДНК

Образцы гомогенизировали в 1 мл раствора ExtractRNA и инкубировали при комнатной температуре около 15 мин, после чего центрифугировали на максимальной скорости при комнатной температуре в течение 10 мин. Отбирали супернатант в новую пробирку и добавляли к нему 0,2 мл хлороформа. После активного перемешивания переворачиванием в течение 15 сек. и инкубации при комнатной температуре в течение 2-3 мин., образцы центрифугировали на максимальной скорости при +4°C в течение 15 мин. При центрифугировании жидкость разделялась на три фазы, мы отбирали верхнюю водную фазу,

содержащую РНК, в новую пробирку и добавляли к ней 500 мкл изопропанола. Вортиксовали и инкубировали смесь в течение 10 мин при комнатной температуре. После чего центрифугировали образцы на максимальной скорости 10 мин при комнатной температуре. Осторожно отбирали супернатант. К осадку добавляли 75% этиловый спирт по стенке пробирки, центрифугировали на максимальной скорости 5 минут при комнатной температуре. Отбирали супернатант и высушивали осадок РНК на воздухе.

К высушенному осадку РНК добавляли 100 мкл очищенной от РНКаз воды и проводили дополнительную очистку набором CleanRNA Standard. К образцу добавляли 350 мкл “Связывающего раствора для РНК”, перемешивали на вортексе, добавляли 250 мкл 96% этилового спирта и перемешивали переворачиванием пробирки. После чего переносили пробу в спин-колонку и центрифугировали 30 сек на максимальной скорости для сорбирования РНК на фильтре колонки. Промывали РНК “Промывочным раствором для РНК” дважды. Затем центрифугировали пустую колонку 5 мин для полного осушения фильтра колонки. Смывали РНК 20 мкл нагретой до +50°C воды, очищенной от РНКаз воды.

Чтобы синтезировать для реакции ПЦР в реальном времени проводили реакцию обратной транскрипции набором MMLV RT kit. Для реакции обратной транскрипции использовали 1 мкг РНК-матрицы. Реакционную смесь, состоящую из 6 мкл РНК и 1,5 мкл oligo-dT primers (20 мкМ) и 1,5 мкл Random primers (20 мкМ), инкубировали при 70°C в течение 2 мин. для денатурации РНК, в это время готовили смесь master mix: 2 мкл воды, buffer 5x 4мкл, dNTP 0,5мМ, 1мМ DTT. К образцам на льду добавляли master mix, пипетировали. В пробирки для добавляли 5 ед/мкл MMLV ревертазы. Инкубировали смесь 45 мин. 37°C. Чтобы инактивировать фермент, смесь прогревали в течение 10 мин при 70°C.

3.2.4. Анализ результатов методом ПЦР в реальном времени

Для проведения ПЦР-реакции использовали готовую реакционную смесь qPCRmix-HS SYBR в соответствии с инструкцией производителя. В общий

объем смеси 25 мкл входили: 5x реакционная смесь qPCRmix-HS SYBR 5мкл (1x), праймеры 0,2 мкМ, ДНК-матрица 10 нг.

Таблица 3. Праймеры для ПЦР в реальном времени, использованные в работе

Название гена	Последовательности праймеров	Длина фрагмента
<i>Xenopus laevis</i>		
<i>mpo-A (mpo)</i>	Forward primer: 5'-GTTTACCCTGCTTTTTGGCTG	97
	Reverse primer: 5'-GCTATGCGATTGTGTTCTCTC	
<i>retinoid X receptor gamma (rxrg)</i>	Forward primer: 5'-CTTCCTTCTCGCACCGCTC	98
	Reverse primer: 5'-GCCTACTCCCGCATTGTGT	
<i>pou class 5 homeobox 3, gene3 (pou5f3.3)</i>	Forward primer: 5'-CACAAAACCTGGACTTACTGGGG	70
	Reverse primer: 5'-TCTCAACTGCCCTTACCTTCTC	
<i>pou class 5 homeobox 3, gene1 (pou5f3.1)</i>	Forward primer: 5'-ATTAGGGAGAATGGCGGGGA	117
	Reverse primer: 5'-CAGTGGGACCGTGGGAAAAA	
<i>pou class 5 homeobox 3, gene 2 (pou5f3.2)</i>	Forward primer: 5'-CCCTGTTGGACACTATGCG	113
	Reverse primer: 5'-CCCTGTTGGACACTATGCG	
<i>xvent-2B protein (ventx2.1)</i>	Forward primer: 5'-GCACCGCAGCCCAC	141
	Reverse primer: 5'-GGAGTTGAAGGGAGTCAGG	
<i>xbr-1a/xvent2 protein (ventx2.2)</i>	Forward primer: 5'-CAACAGCACCTTGGGC	125
	Reverse primer: 5'-CTGCGGGAGGACAGAAGTC	
<i>forkhead box D1 (foxd1)</i>	Forward primer: 5'-GGGCAACTACTGGACGC	119
	Reverse primer: 5'-CGGGCTCCCTAAGCACAA	
<i>frizzled-related protein 2 (sfrp2)</i>	Forward primer: 5'-TGTC AAGCGGTGGCAGAAA	132
	Reverse primer: 5'-GGACGAGTTCCCAAAAACGG	
<i>catenin, beta interacting</i>	Forward primer: 5'-TTCGCAGGCAGCAGAGAAAC	77
	Reverse primer: 5'-CAAGTCCACCCCAACACA	

<i>protein 1</i> (<i>ctnnbip1</i>)		
<i>tumorhead</i> (<i>trhd</i>)	Forward primer: 5'-TCACGACAAACCGAAATGGC	75
	Reverse primer: 5'-GGAAGGCAGAGTCCATGTGT	
<i>NK2 homeobox 1</i> (<i>nkx2-1</i>)	Forward primer: 5'-GCTCTGATTATGGCTCGGCT	181
	Reverse primer: 5'-CCTCCCCTTCCCTTTTTG	
<i>homeobox</i> <i>protein</i> (<i>hoxd1</i>)	Forward primer: 5'-TTGCTGTTGTTCCCTGTGCC	71
	Reverse primer: 5'- GAGTTCAGTCAGTTCAGTCAGTTC	
<i>HNF1 homeobox</i> <i>B</i> (<i>hnf1b</i>)	Forward primer: 5'-GACGACTTTGATACCCCTCCA	91
	Reverse primer: 5'-GCATCCTGTCCACTTCTGCC	
<i>sonic hedgehog</i> (<i>shh</i>)	Forward primer: 5'-AGCAACATCCAACCAGGAGA	73
	Reverse primer: 5'-CCACTTTCACCGCCTTCA	
<i>meis homeobox 3</i> (<i>meis3</i>)	Forward primer: 5'-GTGTTGAGCCCTTATCCAGC	196
	Reverse primer: 5'-TCCTCCATCAGAGTGTTATTCCT	
<i>spalt-like</i> <i>transcription</i> <i>factor 4</i> (<i>sall4</i>)	Forward primer: 5'-ACGGTCAGCAAAGCAACATC	126
	Reverse primer: 5'-GCCCTGCCACAAATCGTA	
<i>spalt-like</i> <i>transcription</i> <i>factor 3 S</i> (<i>sall3</i>)	Forward primer: 5'-CGTGGTCGTCGGCTATCT	117
	Reverse primer: 5'-GCCAGAGTCAACATTCATTGCT	
<i>spalt-like</i> <i>transcription</i> <i>factor 1</i> (<i>sall1</i>)	Forward primer: 5'-GCATTCACTACAAAAGGCAACC	114
	Reverse primer: 5'-TCCAAGAAAAGCCATAGGTCCA	
<i>SRY-box 2</i> (<i>sox2</i>)	Forward primer: 5'- GCTGTGGCGGGAGAGAGAAAGT	178
	Reverse primer: 5'- TGGTTGTTGGACGCAGAGTTGGA	
<i>SRY-box 17</i> <i>alpha</i> (<i>sox17a</i>)	Forward primer: 5'-TCTTCTGTCCTTCCGATGCC	74
	Reverse primer: 5'-ACGGTGTGAGTCTCTCAGGC	
<i>snail family zinc</i> <i>finger 2</i> (<i>snai2</i>)	Forward primer: 5'-GCCCTATTTCTTGTGCGT	113
	Reverse primer: 5'-TCGTAAAGCACCTGAGAATGA	
<i>SRY-box 15</i> (<i>sox15</i>)	Forward primer: 5'-GGAGCTCTATGGGTACCT	153
	Reverse primer: 5'-ACTGGACCTGTTGCTGAA	

<i>tubulin alpha 4b</i> (<i>tuba4b</i>)	Forward primer: 5'-ACACGGCATTGATCCTACAG	250
	Reverse primer: 5'-AGCTCCTTCGGTGTAATGAC	
<i>SRY-box 9 (sox9)</i>	Forward primer: 5'-CTGGGGAAGTTATGGAGGCTTT	153
	Reverse primer: 5'-TTGTTCTGACTGCCCGTTCT	
<i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1</i> (<i>eef1a1</i>)	Forward primer: 5'- GTTCAATTTACCGCACAGGTTATCA	70
	Reverse primer: 5'-ACACAGGGGCATATCCAGCA	
<i>ornithine decarboxylase 1</i> (<i>odc1</i>)	Forward primer: 5'- GCCAGTTCTAACAAGAAACCCA	93
	Reverse primer: 5'-TCTACGATACGATCCAGCCCA	
<i>kruppel-like factor 4 (klf4)</i>	Forward primer: 5'-ATGAACCGACCCGCCAC	171
	Reverse primer: 5'-AAGCTCGATCACATCGCTGA	
<i>kruppel-like factor 5 (klf5)</i>	Forward primer: 5'-ACTACCCTGGTAAGAACCTACA	132
	Reverse primer: 5'-CCCTTTTCCCATGACAGGA	
<i>kruppel-like factor 11 (klf11)</i>	Forward primer: 5'-AAGAAATTTGCCTGCCCCGT	152
	Reverse primer: 5'-TGTATTTTGTCCGACGCAGAGA	
<i>elastin microfibril interfacier 2</i> (<i>emilin2</i>)	Forward primer: 5'-GGCTGAATGGAATGGAATGG	122
	Reverse primer: 5'-GCCCTCAATAGGAGCAGTGAA	
<i>SRY-box 21</i> (<i>sox21</i>)	Forward primer: 5'-GAGTGGAAGTTGCTGACCGA	133
	Reverse primer: 5'-GACCCCAGCCCCATGTAAAC	
<i>synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein (ssx2ip)</i>	Forward primer: 5'-TCGTGTGTCCTTGCTATTCCT	91
	Reverse primer: 5'- CCAACATAAAAGAGTTTGAGGGGA	
<i>guanine nucleotide binding protein</i> (<i>gngt1</i>)	Forward primer: 5'-CGATAACCCAACCGCACC	85
	Reverse primer: 5'-TACAACCCGCAAAGCAACA	
<i>wnt8</i>	Forward primer: 5'-GAGGGAACGGGATTCCAACA	115

	Reverse primer: 5'-GCAAACAAATCCACTGGCCC	
<i>SRY-box 8 (sox8)</i>	Forward primer: 5'-CAAACGGGACGGGGAAGAA	179
	Reverse primer: 5'-GTGCCCAAACCATAAAGGCG	
<i>orthodenticle homeobox 1 (otx1)</i>	Forward primer: 5'-CTCTTCCGACAGCTGATCCC	160
	Reverse primer: 5'-GGGGCTGTTTGAGGTAGGAC	
<i>pinhead (pnhd)</i>	Forward primer: 5'-TGCCTACATGTCTGGCACAA	101
	Reverse primer: 5'-GAGCCCCAAAACCTCAAACC	
<i>zyxin (zyx)</i>	Forward primer: 5'-CATTTAAGGCCCCGGAAGAGC	245
	Reverse primer: 5'-TGGGAATGAACCACCAGAGG	
<i>glycogen syntase kinase 3 beta (gsk3b)</i>	Forward primer: 5'-GTGGTCAGCAGGCTGTGTAT	204
	Reverse primer: 5'-CGTGCTCGGAACACCTTAGT	
<i>notochord homeobox (not)</i>	Forward primer: 5'-CTGCCTCCAAACTATCCATGG	111
	Reverse primer: 5'-TGATGAGCCACACGGGTG	
<i>myogenic differentiation 1 (myod1)</i>	Forward primer: 5'-GGACTCAGATGCCTCAAGCC	101
	Reverse primer: 5'-TGCTGTCGTAGCTGTTCTTCTC	
<i>cardiac actin (actc1)</i>	Forward primer: 5'-GCTGACAGAATGCAGAAG	212
	Reverse primer: 5'-TTGCTTGGAGGAGTGTGT	
<i>neural cell adhesion molecule 1 (ncam1)</i>	Forward primer: 5'-CACCCTGTACCGCCTGATT	190
	Reverse primer: 5'-ATTCCCAATAACACCACCCT	
<i>tubulin beta 2B class Iib (tubb2b)</i>	Forward primer: 5'-AAGCAACAAGAAAGGGCCAC	177
	Reverse primer: 5'-CATGGTAACTGCCGGTAGGA	
<i>Danio rerio</i>		
<i>ventral expressed homeobox (vent)</i>	Forward primer: 5'- CAGAGGAGGAAGATAGCGGAGAA	135
	Reverse primer: 5'- AAAAACAGCGGGATAGAGGAAGT	
<i>nanog homeobox (nanog)</i>	Forward primer: 5'-CCTGTGGGCAACTAAAGGAAT	79
	Reverse primer: 5'-AGGCTGTGTGGCTGAAGATT	
	Forward primer: 5'-TGCCCTTTGATGACGAGTGT	99

<i>pou domain, class 5, transcription factor 3 (pou5f3)</i>	Reverse primer: 5'-GATAGCCTTGACCTGGGAGC	
<i>SRY-box 2 (sox2)</i>	Forward primer: 5'-GACCAACTCGCAGACCTACAT	87
	Reverse primer: 5'-GAGCCCAGTGTCATTCCCG	
<i>kruppel-like factor 4 (klf4)</i>	Forward primer: 5'-GGACCCTCACGCGTTTAGTT	197
	Reverse primer: 5'-TGGGTTTGGATTCTTCCGGC	
<i>elongation factor 1-alpha (ef1a)</i>	Forward primer: 5'- AAGAACGTGTCAGTCAAGGACAT	76
	Reverse primer: 5'- CGTAACCCTGAGAGATCTGACCA	
<i>ornithine decarboxylase 1 (odc1)</i>	Forward primer: 5'-CTCCACCTTCAATGGCTTCCAG	87
	Reverse primer: 5'-AGTGGGATGGCACGTTTCCAG	
<i>Homo sapiens</i>		
<i>GAPDH</i>	Forward primer: 5'-GGGAAGGTGAAGGTCGGAGT	70
	Reverse primer: 5'-AGTTAAAAGCAGCCCTGGTGA	
<i>EEF1A1</i>	Forward primer: 5'-GCCAGAACACAGGTGTCG	121
	Reverse primer: 5'-GATGGCCAGTAGTGGTGGA	
<i>NANOG</i>	Forward primer: 5'-ATGGTGTGACGCAGAAGG	138
	Reverse primer: 5'-GGTTGCTCCAGGTTGAATTGT	
<i>OCT4</i>	Forward primer: 5'- TCTATTTGGGAAGGTATTCAGCC	86
	Reverse primer: 5'-GCCGCAGCTTACACATGTT	
<i>SOX2</i>	Forward primer: 5'-CAACGGCAGCTACAGCATGA	150
	Reverse primer: 5'-ATGTAGGTCTGCGAGCTGGT	
<i>KLF4</i>	Forward primer: 5'-ACTTGTGATTACGCGGGCT	86
	Reverse primer: 5'-GGTTTCTCACCTGTGTGGGTT	

При анализе результатов реакции ПЦР в реальном времени мы обращали внимание на номер цикла ПЦР ($C(t)$), когда флуоресцентный сигнал начинает детектироваться прибором, это свидетельствует о том, что количество ДНК в реакционной пробирке достигает определенной, заданной пороговой $N(t)$

величины. Сравнивая полученные значения $C(t)$, мы определяли относительное количество кДНК в исследуемых образцах. Относительное количество ДНК вычисляется по формуле $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Где $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ образца } 1 - \Delta C_t \text{ калибровочного образца} = (C_t \text{ образца} - C_t \text{ внутреннего контроля образца}) - (C_t \text{ калибровочного образца} - C_t \text{ внутреннего контроля калибровочного образца})$. Чем меньше $C(t)$ в образце, тем больше в нем было целевой кДНК в начальный момент времени. В качестве внутреннего контроля мы измеряли экспрессию двух генов домашнего хозяйства (housekeeping gene) – *odc1* и *eef1a1*.

3.2.5. Создание генетических конструкций

Для клонирования фрагмента ДНК, содержащего кодирующую рамку исследуемого гена, был использован метод ПЦР с обратной транскрипцией. В качестве матрицы использовали кДНК, синтезированную обратной транскриптазой SuperScript на основе фракции тотальной РНК, выделенной из зародышей *Xenopus laevis* на 6 и 13 стадиях развития.

Таблица 4. Векторные конструкции, использованные в работе

ДНК-конструкция	Праймеры и стратегии клонирования, использованные для создания ДНК-матриц для антисмысловых dig-РНК зондов
<i>pAL2-T-pou5f3.3</i>	1. ПЦР с тотальной кДНК <i>Xenopus laevis</i> с праймерами forward primer 5'- atgc gaattcaATGGACCAGCCCATATTGTA и reverse primer 5'- atgc ctgag TCAGCCGGTCAGGACCCC 2. Полученные фрагменты кДНК были клонированы в вектор pAL2-T В конструкции фрагмент стоит перед промотором spб, что позволяет синтезировать антисмысловый зонд.
ДНК-конструкция	Праймеры и стратегии клонирования, использованные для создания люциферазных репортеров
<i>pNL1.1 - pr pou5f3.3.L</i>	1. ПЦР с геномной ДНК <i>Xenopus laevis</i> с праймерами forward primer 5'- atgcctcgagATTTTATGCTTCCAGGATGTAAGC и reverse primer 5'- atgcaagcttAACTCTTCCAACCCAAGGCCTG

	2.Рестрикция по сайтам XhoI и HindIII. Лигирование в вектор <i>pNL1.1</i> vector (Promega).
ДНК-конструкция	Праймеры и стратегии клонирования, использованные для создания ДНК-матриц для синтетических мРНК
<i>pCS2MT-pou5f3.3</i>	1.ПЦР с плазмиды <i>pAL2-T-pou5f3.3</i> с праймерами forward primer 5'- atgcgaattcaATGGACCAGCCCATATTGTA and reverse primer 5'- atgc ctcgag TCAGCCGGTCAGGACCCC 2. Рестрикция по сайтам EcoRI и XhoI. Лигирование в вектор pCS2-MT.
<i>pCS2MT-ybx1</i>	1. ПЦР с тотальной кДНК <i>Xenopus laevis</i> с праймерами forward primer 5'- atgccatggttATGAGCAGCGAGGTTGAAACAC и reverse primer 5'- atgcctcgagТТАСТCAGCCCCGCCCTGCTCAGCC 2.Рестрикция по сайтам NcoI и XhoI. Лигирование в плазмиду pCS2-MT.
<i>pCS2MT-ybx1-front</i>	1.ПЦР с плазмиды <i>pCS2Myc-ybx1</i> с праймерами forward primer 5'- atgccatggttATGAGCAGCGAGGTTGAAACAC и reverse primer 5'- atgcctcgagTTTGCTGCCTTGGACTGGAA 2.Рестрикция по сайтам NcoI и XhoI. Лигирование в плазмиду pCS2-MT.
<i>pCS2MT-CTD ybx1</i>	1.Рестрикция <i>pB42- CTD ybx1</i> по EcoRI и XhoI 2. Клонирование CTD Ybx1 в плазмиду <i>pCS2-MT RI</i> .
<i>pCS2-ybx1-3xflag</i>	1.ПЦР с плазмиды <i>pCS2Myc-ybx1</i> с праймерами forward primer 5'- aattaggcctgccgccaccATGAGCAGCGAGGTTGAAAC и reverse primer 5'- aattctcgagAGCCCCGCCCTGCTCAG 2.Рестриция по сайтам Eco147I и XhoI. Клонирование в плазмиду pCS2-3xflag по сайтам BamHI-Klenow и XhoI
<i>pCS2-ybx1 front-3xflag</i>	1. ПЦР с плазмиды <i>pCS2Myc-ybx1</i> с праймерами forward primer 5'- aatt aggcct gccgccacc ATGAGCAGCGAGGTTGAAAC и reverse primer 5'-atgc ctcgag TTTGCTGCCTTGGACTGGAA 2. Рестриция по сайтам Eco147I и XhoI. Клонирование в плазмиду pCS2-3xflag по сайтам BamHI-Klenow и XhoI.

<i>pCS2-D.r. Zyxin-3xмус</i>	<p>1. ПЦР с тотальной кДНК <i>D. rario</i> с праймерами forward primer 5'- aatt aggcctgcccgcaccATGGAGACTAGTGGACCTTT и reverse primer 5'- aatt ctcgag CTGTTTGGCCTGCTTGTTAC</p> <p>2. Рестриция по сайтам Eco147I и XhoI. Клонирование в плазмиду pCS2-3xмус по сайтам BamHI-Klenow и XhoI.</p>
<i>p35T-Zyxin</i>	Плазмиды получены в лаборатории Молекулярных основ эмбриогенеза ранее (Martynova et al, 2008)
<i>p35T-FLAG-ZyxinLIM1-3</i>	
<i>pCS2Myc-N part Zyxin</i>	
ДНК-конструкция	Праймеры и стратегии клонирования, использованные для создания плазмид для бактериальной экспрессии
<i>pGex4T-1-Zyxin LIM1;</i>	Плазмиды получены в лаборатории Молекулярных основ эмбриогенеза ранее (Martynova et al, 2008)
<i>pGex4T-1-Zyxin LIM2;</i>	
<i>pGex4T-1-Zyxin LIM3</i>	
<i>pGEX4T1 – pou5f3.3.L126-136aa</i>	<p>Фрагмент получен путем отжига двух праймеров:</p> <p>forward primer: 5' AATTCTGGCATTATCCCTCCTGGCAGCAGGGGAACCTAC</p> <p>и reverse primer: 5' TCGAGTAGGTTCCCCTGCTGCCAGGAGGGATAATGCCAG</p> <p>Рестрикция по сайтам EcoR1 and XhoI. Лигирование в плазмиду <i>pGEX4T1</i></p>
ДНК-конструкция	Праймеры и стратегии клонирования, использованные для создания плазмид для экспрессии в дрожжах
<i>pMW103Zyxin LIM 1-3</i>	Плазмиды получены в лаборатории Молекулярных основ эмбриогенеза ранее (Martynova et al, 2008)
<i>pB42ADZyxinLIM1-3</i>	
<i>pB42AD CTD ybx1</i>	
<i>pMW103 CTD ybx1</i>	

ДНК-конструкция	Праймеры и стратегии клонирования, использованные для создания плазмид для метода CRISPR/Cas9
<p><i>pSpCas9(bb)-2A-Puro</i> - <i>ZYX CRISPR Guide RNA</i> 3,4, 5 elements</p>	<p>Фрагменты были получены путем отжига двух праймеров: Для <u>ZyxinCas9. 3 elements</u>; CCGAGATGAGACTGTGCGAG Direct CACCCcgagatgagactgtgcgag Reverse AAACctcgcacagtctcatctcgg Для <u>ZyxinCas9.4 element</u>; ATCATTTCCCCCTGCGCCTC Direct CACC atcattccccctgcgctc Reverse AAACgaggcgcaggggaaatgat Для <u>Zyxin Cas9.5 element</u> TGGATATGTGCCCCCACCAG Direct CACCtggatatgtgccccaccag Reverse AAACctggtggggcacatatcca Рестрикция BstV21. Лигирование в плазмиду <i>pSpCas9(bb)-2A-Puro</i></p>
<p><i>pAL2T-clone #44</i></p>	<p>1. ПЦР с геномной ДНК клеток НЕК293clone 44 со внешними праймерами: forward primer 5'- GTTCTTGGGTTAGGGGTTAGAG и reverse primer 5'- GTCTGGGACTGGACATGGAGTT. 2. Небольшое количество ПЦР продукта использовано в качестве матрицы для второго раунда ПЦР со внутренними праймерами: forward primer 5'- CTTTCCCCTGCCTCCAC и reverse primer 5'- CCAAACCTCGCCCTTCCCCTCAGGCCCTCCCTCC 3. Полученный ДНК фрагмент лигирован в вектор pAL2-T</p>

Амплификация ДНК методом ПЦР

ПЦР проводили, используя набор Encyclo Plus PCR kit или Tersus Plus PCR kit. В состав реакционной смеси входили: 1x Encyclo Red/ Tersus Red буфер, смесь dNTP (конечная концентрация 0.25 мМ), праймеры (0.5 пмоль/мкл), матричная ДНК (для плазмиды 0.01-1нг на 25 мкл реакционной смеси), термостабильная ДНК-полимераза (0.5 ед. на 25 мкл реакционной смеси), вода mQ. Реакцию проводили в амплификаторе в режиме с нагреванием крышки. Количество циклов зависело от начального количества матрицы и требуемого

количества продукта реакции, температуру на стадии отжига рассчитывали, основываясь на длине и GC-составе праймеров, при расчете длительности стадии элонгации учитывали длину амплифицируемого фрагмента ДНК.

Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле

Анализ длины полученного в результате ПЦР фрагмента проводили путем электрофоретического разделения ДНК в 1,5% агарозном геле с интеркалирующим красителем бромистым этидием в концентрации 0.5 мкг/мл, в буфере 1xTAE при напряжённости электрического поля 80V. Параллельно с нанесением образцов ДНК на гель наносили маркер длины 1 kb или 100+ DNA Ladder. Визуализацию ДНК осуществляли на УФ-транслюминаторе.

Очистка ДНК из реакционной смеси

Очистку ДНК из реакционной смеси производили набором Cleanup Standard. К реакционной смеси добавляли 5 объемов «Связывающего раствора» и перемешивали. Пробу переносили в спин-колонку, помещенную в собирательную пробирку, и центрифугировали на максимальной скорости 30 сек, после чего удаляли фильтрат из собирательной пробирки. В колонку наливали 700 мкл «Промывочного раствора» и центрифугировали на максимальной скорости 30 сек. Фильтрат сливали и центрифугировали колонку в течение 60 сек для полного удаления промывочного раствора. Очищенную ДНК элюировали с колонки 30 мкл воды mQ.

Расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции

Реакционная смесь состояла из 1x буфера для эндонуклеаз рестрикции, ДНК, воды mQ и фермента. Расщепление продуктов ПЦР и плазмидной ДНК проводили в течение 14-16 ч. при +37°C.

Лигирование молекул ДНК

Продукты ПЦР и плазмидную ДНК после рестрикции лигировали ферментом ДНК-лигазой бактериофага T4. В состав реакционной смеси входили фермент, лигируемые фрагменты, 1xбуфер и вода mQ. Молярное соотношение

вектор/вставка составляло 1:5–1:10. Лигирование проводили в объеме 20 мкл в течение ночи при +4°C.

Трансформация клеток *E. coli*

К 200 мкл химически компетентных клеток *E. coli* добавляли 5 мкл лигазной смеси или 1 мкл плазмидной ДНК и инкубировали 30 мин на льду. Затем прогревали 45 сек. при 42°C и охлаждали на льду. Добавляли 1 мл среды LB без селективного антибиотика и инкубировали 40 мин при 37°C при интенсивной аэрации, после чего высевали на твердую среду LB с селективным антибиотиком, для наращивания биомассы инкубировали в течение 14-16 ч. при +37°C.

Выделение плазмидной ДНК из бактерий *E.coli*

Для выделения плазмидной ДНК использовали набор Plasmid Miniprep. Клетки *E.coli* наращивали в 20-25 мл среды LB с селективным антибиотиком в течение 16-18 ч. при +37°C и интенсивной аэрации (200 об/мин). После чего их осаждали центрифугированием на 2500 об/мин в течение 15 мин. и осадок ресуспендировали в 250 мкл «Ресуспендирующего раствора». Затем добавляли равный объем «Лизирующего раствора», перемешивали переворачиванием до просветления раствора. Далее добавляли 350 мкл «Нейтрализующего раствора», перемешивали переворачиванием до образования творожистой взвеси с последующим центрифугированием 10 мин. на 13,4 тыс. об/мин. Супернатант переносили в спинколонку и центрифугировали 30 сек. Плазмидная ДНК в процессе центрифугирования сорбировалась на силиконовом носителе колонки. Супернатант промывали 200 мкл «Раствора для удаления эндотоксинов» и 700 мкл «Промывочного раствора», затем ДНК элюировали 50 мкл воды mQ.

3.2.6. Транскрипция *in vitro*

Синтетические мРНК получали с использованием наборов mMessage mMachine по методике производителя. Матрицей служили плазмидные конструкции на основе вектора pCS2-MT+, линейаризованные по сайтам NotI и

конструкции на основе вектора p35T+, линейаризованные по сайту Vsp1. Транскрипцию *in vitro* осуществляли с использованием SP6 РНК-полимеразы. В реакцию брали 1,5 мкг линейаризованной плазмиды, 10 мкл 2х смеси нуклеотидов, 2мкл 10хбуфера, водой доводили до 18 мкл, 2мкл SP6 полимеразы (10 ед.) и перемешивали. Инкубировали при +37°C. Через 2 часа добавляли 2 мкл ДНКазы и инкубировали при +37°C еще 15 минут.

После синтеза мРНК очищали при помощи набора CleanRNA Standard и растворяли в воде mQ.

3.2.7. Гибридизация *in situ*

Для изучения локализации транскриптов *rou5f3.3* в эмбрионах шпорцевой лягушки мы использовали метод гибридизации *in situ*. (Harland, 1991). Данная методика включает несколько этапов.

Синтез dig-меченой анти-смысловой РНК для приготовления гибридизационной пробы:

Dig-меченные анти-смысловые РНК получали методом транскрипции *in vitro* с использованием смеси 10х dig-смеси нуклеотидов и SP6 РНК-полимеразы из набора mMessage mMachine по методике производителя. В качестве матрицы использовали продукт ПЦР реакции с плазмиды *pAL2-T-rou5f3.3* с промотером для синтеза анти-смысловой РНК SP6 полимеразой. Полученную dig-меченную анти-смысловую РНК очищали набором CleanRNA Standard. Концентрацию измеряли на спектрофотометре.

Гибридизационная проба представляла собой смесь 0,5-1мкг dig-асРНК с 0,5-1мл РН-буфера.

Фиксация эмбрионов шпорцевой лягушки для проведения гибридизации *in situ*:

С зародышей на стадиях после гаструляции снимали вителлиновую оболочку, зародышей на более ранних стадиях в оболочке помещали в пузырек с 3 мл фиксирующего раствора MEMFA и фиксировали 16-18 часов на качалке

(45 об/мин) при +4 °С. После этого фиксирующий раствор меняли на 96% этиловый спирт и промывали им по 5 мин 4 раза. Образцы оставляли на –20 °С до проведения прегибридизации.

Прегибридизация:

Фиксированные образцы переводили в раствор РТW через ряд последовательных промывок 96%, 75% и 50% водными растворами этилового спирта, затем 25% раствором этилового спирта в РТW по 5 минут при комнатной температуре на качалке 45 об/мин. После чего промывали в РТW 3 раза по 5 мин при комнатной температуре на качалке. Инкубировали в растворе протеиназы К в РТW (1мкг/мл) 10 мин. при на качалке. Промывали 0,1М раствором триэтаноламин гидрохлорида (ТЭА рН 7.5-8.0) 2 раза по 5 минут при комнатной температуре на качалке. К ТЭА после 2-ой промывки добавляли 0,25% уксусного ангидрида, инкубировали 5 минут при комнатной температуре на качалке. После добавления ещё 0,25% уксусного ангидрида, инкубировали 5 мин при комнатной температуре на качалке. Промывали раствором РТW 2 раза по 5 мин при комнатной температуре на качалке. Инкубировали в 3 мл MEMFA 20 мин при комнатной температуре на качалке. Промывали раствором РТW 2 раза по 5 мин. Добавляли 1 мл РТW с 250мкл РН-буфера, инкубировали 5 мин при комнатной температуре на качалке. Инкубировали в 0,5мл РН-буфера 10-15 мин при +60 °С на качалке. Заменяли раствор РН-буфера новым и оставляли на ночь (14-18 часов) при +60 °С на качалке.

Полученные образцы хранили при –20 °С до гибридизации.

Гибридизация (гибридизация РНК с дигоксигенин-меченной антисмысловой пробой к исследуемой РНК):

Образцы после прегибридизации, помещали в зонд для гибридизации и инкубировали ночь при 60 °С на качалке 45 об/мин.

Отмывка от РНК-зонда:

Гибридизационную пробу отбирали, образцы промывали 0,5 мл предварительно нагретого до + 60 °С РН-буфера 2 раза по 30 минут при 60 °С на качалке. Промывали последовательно по два раза на качалке растворами 2x SSC по 40 мин при +60 °С, 0,2xSSC по 40 минут при комнатной температуре, МАВ по 5 минут при комнатной температуре.

Инкубация с dig-специфичными антителами, сшитыми с щелочной фосфатазой:

Образцы инкубировали в МАВ с 2% блокирующего реагента 15 минут при комнатной температуре на качалке. Затем МАВ с 2% блокирующего реагента меняли на МАВ с 2% блокирующего реагента и 20% сыворотки (heat treated lamb serum) и инкубировали 1 ч. При комнатной температуре на качалке. После чего образцы помещали в МАВ, содержащий 2% блокирующего реагента, 20% сыворотки и dig-специфичные антитела, сшитые с щелочной фосфатазой (разведение 1/1000), и инкубировали ночь на качалке при +4 °С.

Отмывка от антител:

Образцы промывали раствором МАВ 5 раз по 1 часу при комнатной температуре на качалке. Последний раз промывали ночь на качалке при 4 °С.

Проявление окраски *in situ*:

Образцы промывали 2 раза по 10 мин 2-3мл буфера для щелочной фосфатазы с 2мМ левамизола при комнатной температуре на качалке. Буфер сливали и добавляли субстрат для щелочной фосфатазы (0,5мл на пузырек) – ВМР с левамизолом (1мМ) и держали образцы в темноте при комнатной температуре на качалке до появления окраски. После развития окраски образцы промывали 2-3мл буфера для щелочной фосфатазы 2 раза при комнатной температуре по 10 минут на качалке. Затем образцы фиксировали в MEMFA при +4 °С на качалке ночь.

Отбеливание:

Образцы отмывали 3 раза по 5 минут в 1xPBS. Затем помещали их в 50% этиловый спирт на 5 минут. Образцы обесцвечивали 10% перекисью водорода в 50% этиловом спирте под УФ-лампой в течение 6-8 часов.

Когда образцы были достаточно обесцвечены, их отмывали 50% этиловым спиртом 3 раза по 5 минут и переводили в раствор MEMFA через 1xPBS.

Полученные образцы фотографировали цифровой камерой под микроскопом в чашке Петри с 2% агарозой в растворе PBS.

3.2.8. Анализ экспрессии эндогенного белка Pou5f3.3: получение специфических антител к Pou5f3.3, гель-электрофорез и иммуноблоттинг

Уровень эндогенного белка Pouf3.3 измеряли в лизатах эмбрионов *Xenopus* на стадии 12 и 16 с помощью SDS-PAGE с последующим вестерн-блоттингом с антителами к Pouf3.3. Для визуализации использовали стабилизированный субстрат Western Blue (Promega).

Были получены поликлональные антитела к фрагменту Pou5f3.3 *Xenopus laevis*, содержащему аминокислотные остатки 125-136 (WHYPSWQQGNLK). Для получения этих антител соответствующую вставку субклонировали в вектор pGEX-4T-1, экспрессировали в штамме *Escherichia coli* DH-5 α с GST на N-конце, из бактериальных лизатов адсорбировали на глутатион-агарозе (Sigma), после промывки PDB, элюировали 50 мМ восстановленным глутатионом и использовали для иммунизации кролика. Для приготовления аффинной колонки синтетический пептид, соответствующий 125-136 а.о. белка Pou5f3.3 иммобилизовали на BrCN-сефарозе (Sigma). Аффинную очистку моноспецифических антител проводили, как описано ранее (Martynova et al., 2008).

3.2.9. Исследование способности к дифференцировке под влиянием активина А

Для обработки активинном А эксплантаты анимальных шапочек (АШ) вырезали у эмбрионов *Xenopus laevis* на стадии 8.5 и культивировали в 1х MMR с 10 нг/мкл активина А до тех пор, пока контрольные эмбрионы не достигли стадии 18.

3.2.10. Анализ данных с люциферазного репортера

Для проверки активности промотора плазмиду *pNL1.1 - pr pou5f3.3 L* (62,5 пг / ооцит) инъецировали вместе с контрольной плазмидой *pRL-TK-Renilla* (Promega) (250 пг / ооцит) в анимальный полюс ооцита. В качестве контроля микроинъецировали исходную плазмиду *pNL1.1 [Nluc] Vector* (Promega). Ооциты инкубировали при 18 ° С в течение 24 часов до определения активности люциферазы.

Для анализа влияния нокдауна *zuxin* и оверэкспрессии *Ybx1* на активность промотора в эмбрионах *Xenopus* плазмиды *pNL1.1 - pr pou5f3.3 L* (12,5 пг / бластомер) и *pRL-TK -renilla* (50 пг / бластомер) смешанные с 0,3 мМ *Zuxin* MO или мРНК *Ybx1* (35 пг / бластомер) инъецировали в каждый бластомер эмбрионов на стадии двух бластомеров. Эмбрионы собирали на стадии 13 для определения активности люциферазы.

Ооциты и эмбрионы для определения активности люциферазы обрабатывали с использованием набора Nano-Glo (Promega). Эмбрионы/ооциты лизировали в Passive lysis buffer по 20 мкл на зародыш/ооцит. Центрифугировали при +4 °С 15 мин 13000 g и отбирали супернатант. Для анализа экспрессии референсной плазмиды к 5 мкл лизата добавляли 25 мкл LARII и 25 мкл Stop&Glo и измеряли люминесценцию на люминометре. Для измерения активности промотора к 10 мкл лизата добавляли 10 мкл реагента NanoGlo, проводили измерение люминесценции на люминометре через 3 мин.

3.2.11. Блокирование транскрипции актиномицином D

Транскрипция в эмбрионах *Xenopus laevis* подавлялась путем микроинъекции 0,2 мМ актиномицина D в бластоцель на стадии 7 (Van der Velden et al., 2000). Эмбрионы развивались до стадии 13.

3.2.12. Анализ белок-белковых взаимодействий

Ко-иммунопреципитация

1. Приготовление лизатов зародышей

Зародыши отбирали в пробирку, на льду добавляли буфер для проведения ко-иммунопреципитации с ингибиторами протеаз и фосфатаз (10мкл буфера/зародыш) и разрушали зародыши пипетированием. Затем пробирки центрифугировали 30 мин при 12.4 тыс. об/мин при +4 °С и супернатант отбирали в новую пробирку.

2. Подготовка смолы

К 50мкл суспензии смолы (протеин G-сефароза с иммобилизованными анти-FLAG или анти-с-тус антителами), добавляли 1 мл буфера, перемешивали, смолу осаждали центрифугированием 2 мин. при 5000 об/мин при КТ и супернатант удаляли. Данную процедуру повторяли еще два раза.

3. Посадка белков на смолу

Супернатант, полученный от центрифугирования лизата зародышей, добавляли к 50 мкл смолы и инкубировали ночь при +4 °С при постоянном перемешивании. Затем центрифугировали 2 мин. при 5000 об/мин при +4 °С, супернатант удаляли.

4. Отмывка белков от смолы

Смолу отмывали на льду 3 раза 1хбуфером с ингибиторами, центрифугировали 2 мин. при 5000 об/мин при +4 °С. Белки неспецифически элюировали со смолы добавлением равного объема 2х буфера для нанесения.

Анализ взаимодействия белков методом Pull-down

Фрагменты Zyxin с GST на N-конце были экспрессировали в штамме *E. coli* BL21, адсорбировали на глутатион-агарозе (Sigma) из бактериальных лизатов, промывали PDB и хранили при 4 °C до использования. Для каждого эксперимента гранулы агарозы, содержащие 20 мг белка, смешивали с 1 мг очищенного фрагмента белка бМус-ΔYbx1, инкубировали в течение 3 часов при 4 °C на нутаторе и 5 раз промывали PDB. Связанные белки солубилизировали в 50 мкл 4х буфера для образцов Лэммли, разделяли с помощью SDS-PAGE и анализировали иммуноблоттингом с моноклональными антителами, конъюгированными с щелочной фосфатазой (Sigma).

3.2.13. Разделение ядерной и цитоплазматической фракций

Эмбрионы *Xenopus* на стадии 2-4 клеток микроинъекцировали синтетическими мРНК (300-400 пг на бластомер) и инкубировали при 18 °C до стадии 13. Эмбрионы инкубировали в течение часа в 0,1хMMR с 150 мг/мл циклогексимида. После инкубации ядерные и цитоплазматические фракции получали, как описано ранее (Martynova et al., 2021).

3.2.14. РНК-иммунопреципитация (RIP)

Для исследования способности Ybx1 связывать мРНК генов плюрипотентности, эмбрионы на стадии двух бластомеров микроинъекцировали РНК *mus-ybx1* (35 пг / бластомер) и РНК Zyxin (50 пг / бластомер). RIP-анализ выполнялся как описано ранее (Martynova et al., 2021).

3.2.15. Обработка лептомицином В

Эмбрионы развивались до стадии 13 в растворе 0,1хMMR с 1 мкг / мл лептомицина В. Суммарную РНК экстрагировали с использованием набора реагентов ExtractRNA (Евроген) и CleanRNA Standard (Евроген), как описано выше, для дальнейших манипуляций.

3.2.16. Нокаут CRISPR / Cas9

Для получения стабильной ZYXIN-нокаутной (KO) линии клеток человека клетки HEK293 трансфицировали векторами ZYXIN CRISPR, и индивидуальные клоны выращивали в полной среде с добавлением 1,2 мкг / мл пурамицина. Клетки, трансфицированные пустым вектором, использовали в качестве контроля. После выращивания в селективной среде отдельные клоны выделяли и тестировали с помощью иммуофлуоресцентного окрашивания и иммуоблот-анализа с использованием моноклонального мышинового антитела 164D4 против человеческого ZYXIN (Synaptic Systems). Для иммуоокрашивания клетки промывали PBS и фиксировали в 3% параформальдегиде в течение 10 мин. при комнатной температуре. Затем клетки обрабатывали 0,1% Triton X-100 в PBS с добавлением 1 мг / мл BSA и инкубировали с первичными антителами 164D4 в разведении 1: 100 (1 ч при комнатной температуре) и вторичными антителами Anti-mouse IgG, конъюгированным с флуорохромом, в том же буфере (1 ч при КТ). Затем содержание ZYXIN в клетках оценивали с помощью микроскопа Zeiss Axiovert 200M. Параллельно с этим были получены образцы ДНК каждого клона для генотипирования мутаций в гене ZYXIN. Для этого целевые области амплифицировали с помощью ПЦР со специфическими внешними праймерами. На следующем этапе 50 нг полученного продукта ПЦР были взяты для ПЦР с внутренними праймерами, прямые праймеры содержали bar-codes, уникальные для каждого клона (все праймеры перечислены в таблице 5). Полученные продукты ПЦР смешивали и генотипировали с помощью NGS. Для определения последовательности вставки в клон 44 этот фрагмент ДНК клонировали в вектор pAL2-T, как описано в таблице 5.

Таблица 5. Праймеры, использованные для генотипирования мутаций в гене ZYXIN

Название	Последовательность праймера
Zyxin H.s. CRISPR external-dir	GTTCTTGGGTTAGGGGTTAGAG
Zyxin H.s. CRISPR external-rev	GTCTGGGACTGGACATGGAGTT
Zyxin H.s. CRISPR-C14-dir2	GGTTAGGGGTTAGAGCGG

Zyxin H.s.CRISPR-C14-revA	AGTGGGAAGGGAAGATCTC
Zyxin H.s.CRISPR-C14-revB	CTGGGGAAGGGAAGATCTC
Zyxin H.s.CRISPR-C14-revC	TACGGGAAGGGAAGATCTC
Zyxin H.s.CRISPR-C15-dir2	ACTCTCTGTCCTCACTGCTG
Zyxin H.s.CRISPR-C15-revD	GCAGGACTTGGAAGTGAATG
Zyxin H.s.CRISPR-C15-revE	ACGGGACTTGGAAGTGAATG
Zyxin H.s.CRISPR-C15-revF	CATGGACTTGGAAGTGAATG

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1. 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. 9). Для получения эмбрионов с нокдауном *zyxin* мы микроинъекцировали в оба бластомера 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 (Parshina et al., 2020).



Рис. 9. 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. 10).

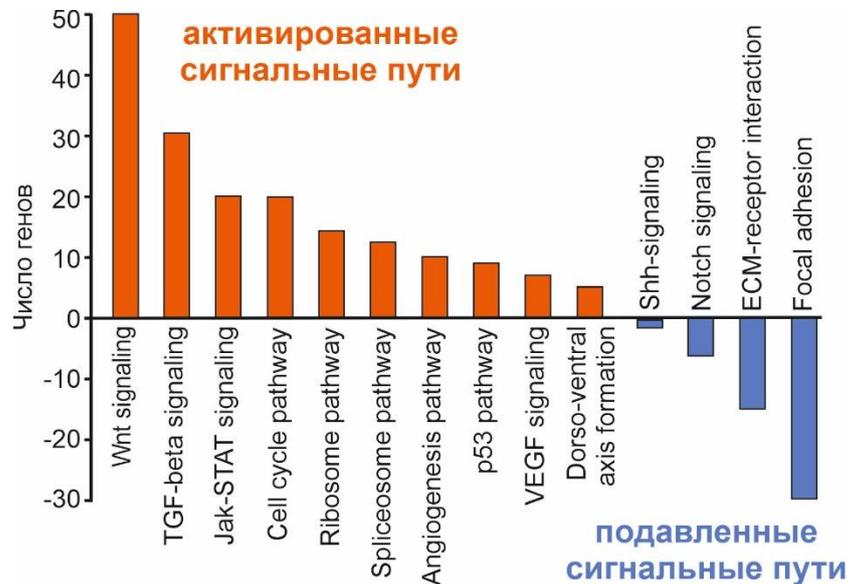


Рис. 10. Сигнальные пути, которые реагируют на нокдаун *zuxin*.

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. 11). В данном случае для получения эмбрионов с нокдауном *zuxin* мы микроинъекцировали 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).

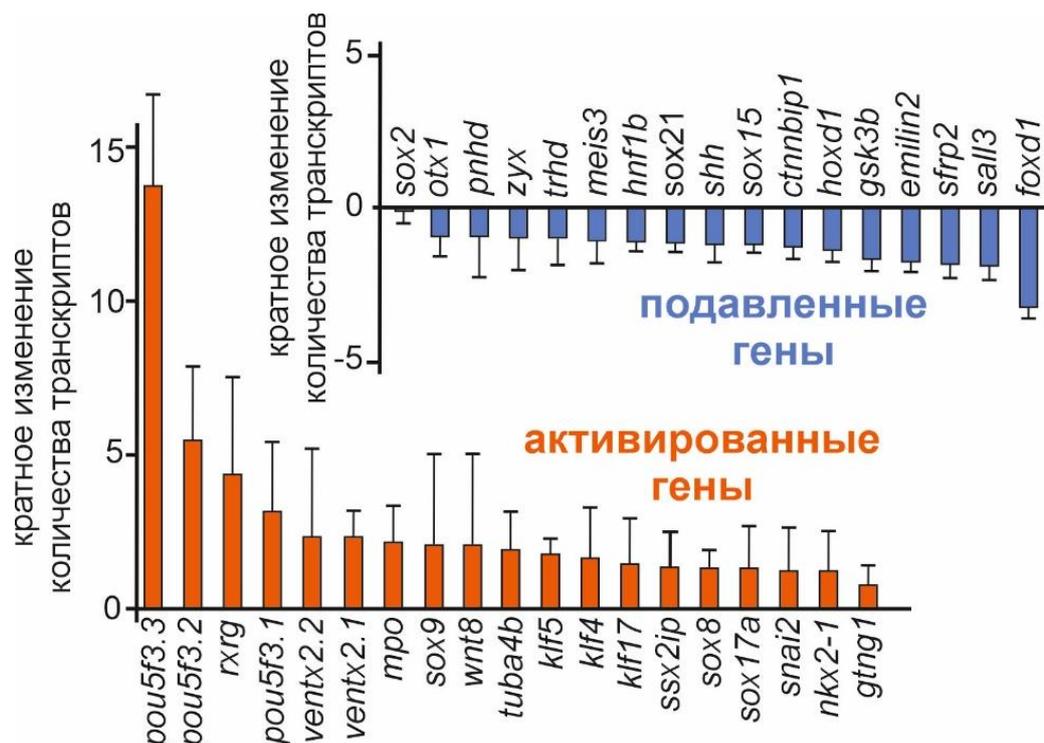


Рис. 11. Подтверждение данных NGS методом qRT-PCR. Данные представлены в виде кратного изменения экспрессии генов. Уровни транскрипции генов домашнего хозяйства *odc* и *efa* использовали для нормализации. Пределы погрешностей показывают стандартное отклонение.

Среди генов с повышенной экспрессией, были обнаружены гены следующих факторов плюрипотентности: *klf4*; гены семейства *pou5f3* (*pou5f3.3*, *pou5f3.2* и *pou5f3.1*), гомологи *POU5F1* млекопитающих; и *vent2.1/2*, функциональный гомолог *NANOG* млекопитающих (Сао, 2015). 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 (Exner et al., 2017).

Среди этих генов плюрипотентности гены семейства *pou5f3* 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 *pou5f3.3*, экспрессия которого изменялась наиболее сильно, мы исследовали уровни мРНК этого гена способом гибридизации *in situ*. Для этого мы

инъекцировали *anti-zuxin* МО 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 МО (рис. 12). 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* МО 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.

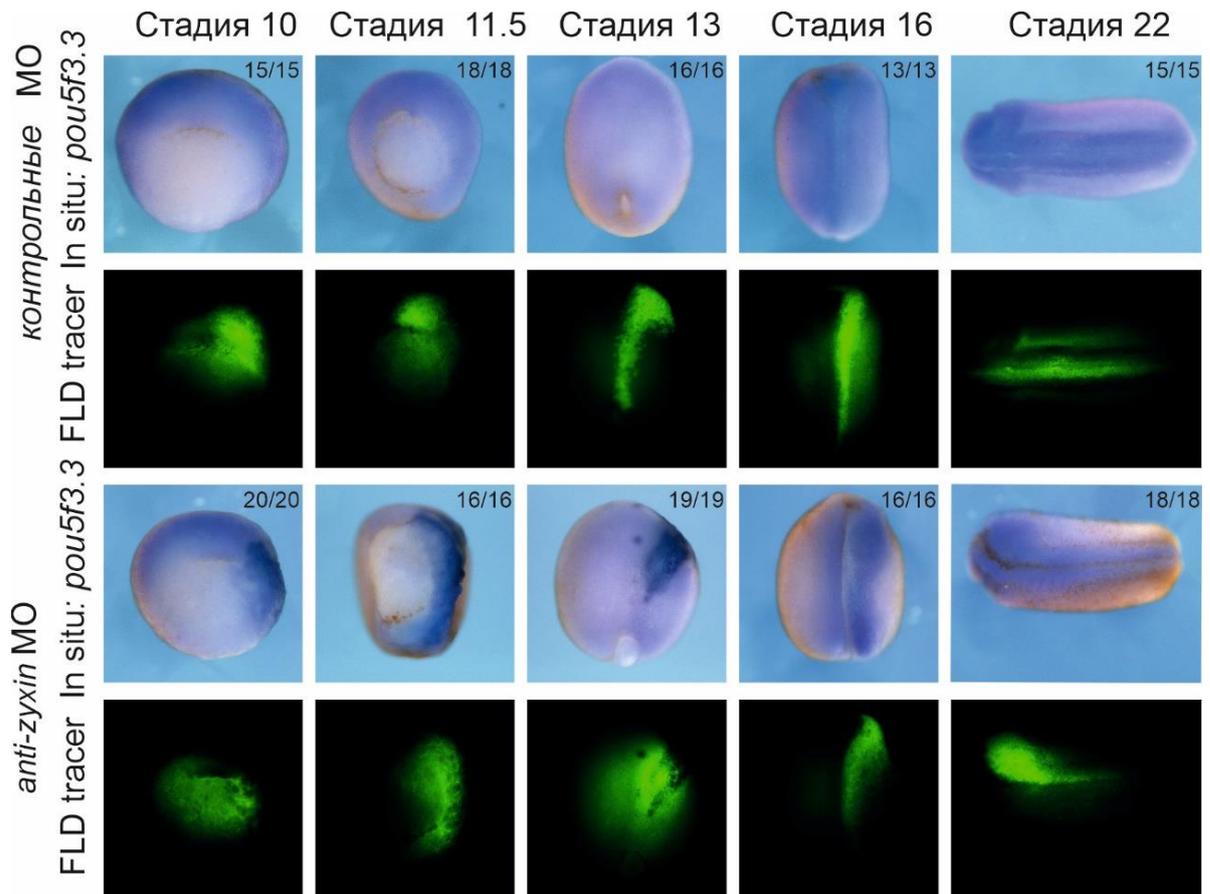


Рис. 12. Гибридизация *in situ* на мРНК *pou5f3.3* после инъекции МО. Локальное усиление экспрессии гена *pou5f3.3* в половинках эмбриона при нокадауне *zuxin* начинается на стадии гастролы (стадия 11) и увеличивается во время нейруляции. Доля эмбрионов, показывающих проиллюстрированный паттерн экспрессии среди всего исследованных эмбрионов указана в правом верхнем углу. Визуализация места инъекции при помощи флуоресцентного трейсера FLD.

Мы предположили, что оверэкспрессия *zuxin* приводит к снижению количества транскриптов генов семейства *pou5f3*. Действительно после микроинъекции экзогенной мРНК *zuxin* мы наблюдали снижение уровней РНК *pou5f3* у эмбрионов (рис. 13).

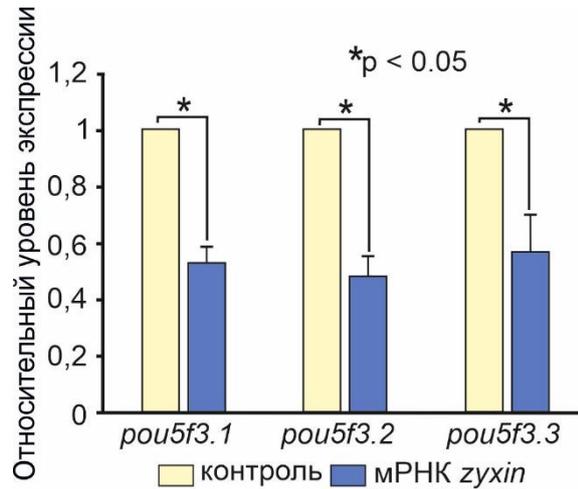


Рис. 13. Оверэкспрессия *zyxin* способствует снижению уровней транскриптов семейства *rou5f3.1-3* на стадии средней гаструлы. Микроинъекция 100 нг / мкл мРНК *zyxin* в каждый бластомер на двухклеточной стадии приводит к снижению количества транскриптов генов семейства *rou5f3* на 11 стадии. * - $p < 0,05$ по критерию Стьюдента.

Поскольку, нокдаун *zyxin* в эмбрионах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* приводил к увеличению количества транскриптов фактора плюрипотентности *rou5f3.3*, а также исходя из фенотипа этих эмбрионов, мы предположили, что подавление трансляции *zyxin* 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 (WHYPSWQQGNLК). Это позволило исследовать экспрессию на уровне эндогенного белка. У эмбрионов с нокдауном *Zyxin* наблюдалось значительное увеличение уровней эндогенного Pou5f3.3 по сравнению с контрольными эмбрионами (рис. 14). Этот результат подтверждает, что выявленное повышение количества мРНК *rou5f3.3* у этих эмбрионов действительно привело к увеличению количества белка.

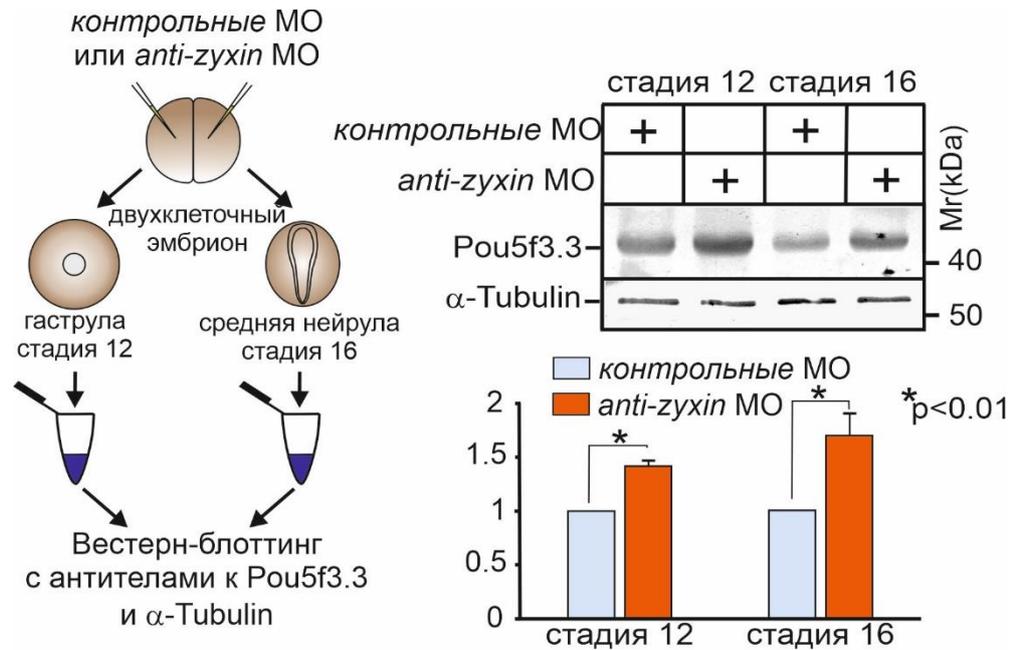


Рис. 14. Нокдаун *zyxin* приводит к увеличению количества эндогенного белка Pou5f3.3. Слева: схема эксперимента. Справа: вестерн-блоттинг с антителами к Pou5f3.3. Ниже справа: статистический анализ данных. * $p < 0,01$ по критерию Стьюдента.

Чтобы проверить физиологическое значение выявленных молекулярных эффектов *Zyxin* 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 (Cao et al., 2006; Cao Y., 2015; Julier et al., 2012). Мы выяснили, что нокдаун *zyxin* вызывает аналогичные эффекты. Эксплантаты АШ зародышей с нокдауном *zyxin* не вытягивались в ответ на добавление в среду активина А, то же происходило с эксплантатами с оверэкспрессией *pou5f3.3* (рис. 15).

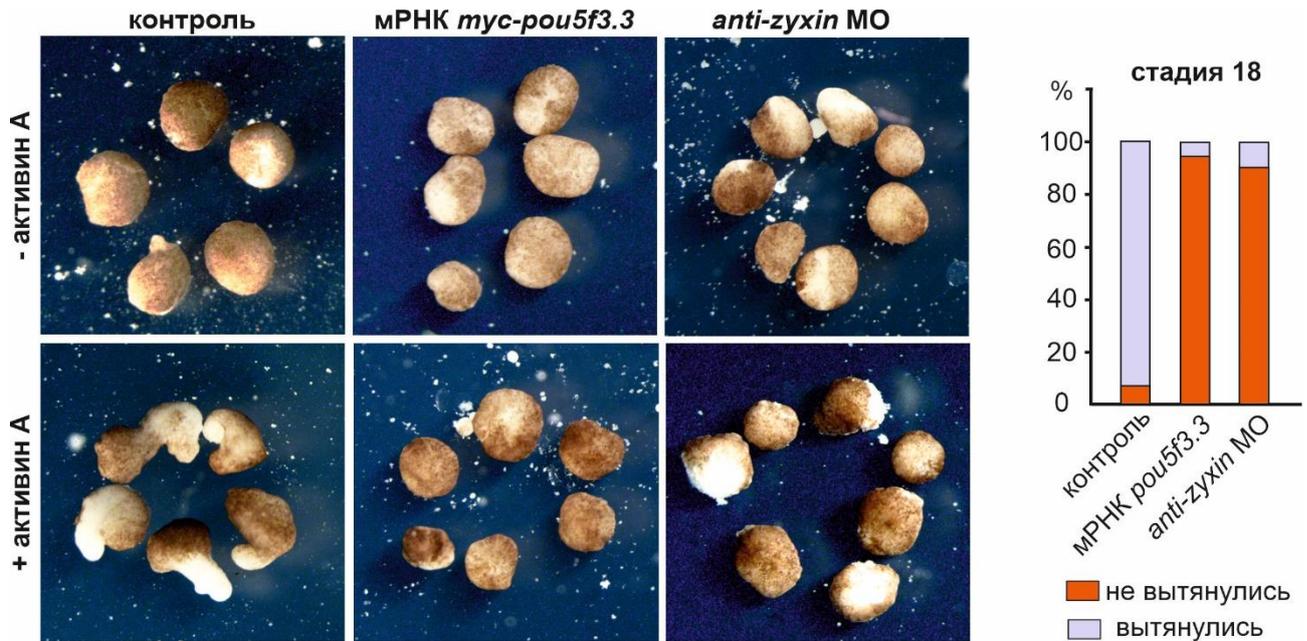


Рис. 15. Zyxin влияет на дифференцировку эмбриональных клеток. Слева: *anti-zyxin* MO ингибируют активность активина А в животных шапочках: шапочки, обработанные активином А (10 нг / мл), вытягиваются на стадии 18. Шапочки, инъецированные мРНК *тус-pou5f3.3* (100 нг / мкл) или 0,3 мМ *anti-zyxin* MO 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-pou5f3.3* 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 нокдауном *zyxin* (рис. 16).

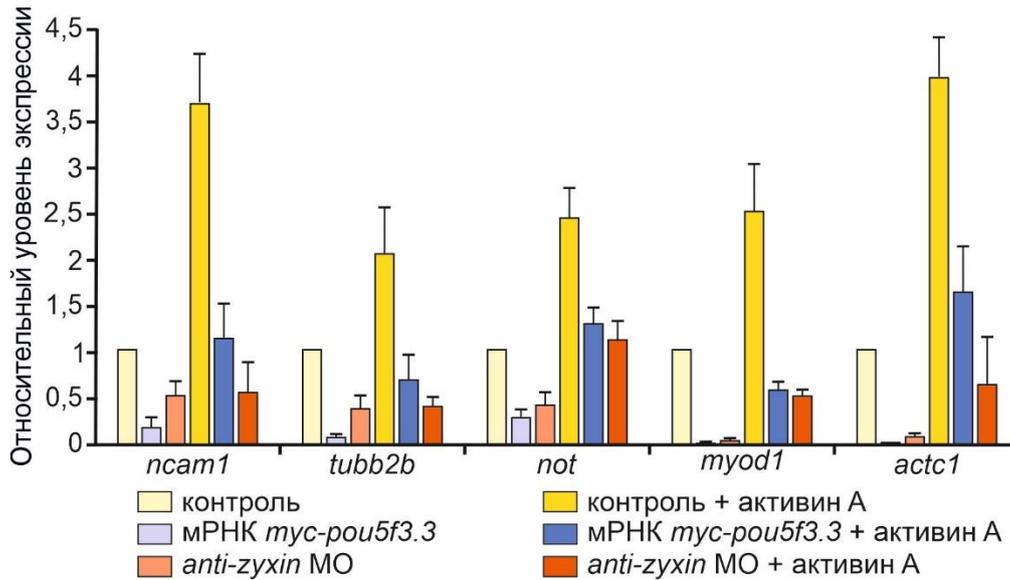


Рис. 16. Согласно результатам qRT-PCR, *anti-zyxin* MO блокируют дифференцировку тканей, индуцированную активинном А, аналогично мРНК *mus-pou5f3.3*. Изменение активности активина А определялось по экспрессии генов, регулирующих клеточную адгезию и модулирование цитоскелета *ncam1* (*neural cell adhesion 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*) (Cao et al., 2006).

4.2. Повышение уровня мРНК *pou5f3.3* происходит вследствие замедления деградации материнских транскриптов, а не из-за активации транскрипции

Чтобы определить, как *Zyxin* регулирует уровни мРНК *pou5f3.3*, мы сначала проверили, может ли *Zyxin* 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 *pou5f3.3* (рис. 17), который по данным литературы отвечает за транскрипцию *pou5f3.3* во время оогенеза (Morichika et al., 2014).

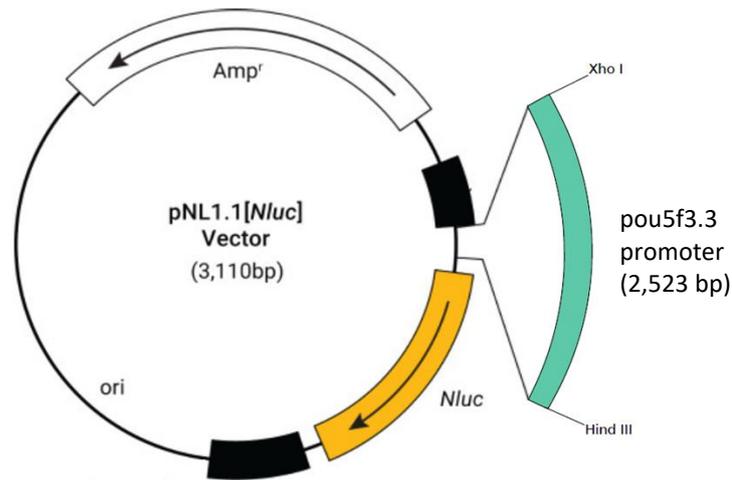


Рис. 17. Репортерная конструкция *pNL1.1-pou5f3.3* с геном люциферазы под контролем участка (- 2523 п.н. – 0 п.н.) промотора гена *pou5f3.3*.

Полученную конструкцию *pNL1.1-pou5f3.3* мы микроинъецировали в эмбрионы *Xenopus laevis* на двухклеточной стадии вместе с контрольным репортером Renilla либо с *antizuxin* МО, либо с контрольными МО.

В результате, мы не наблюдали значимых различий в экспрессии репортерного гена люциферазы под контролем участка промоторной области *pou5f3.3* - 2523 п.н. при инъекции *anti-zuxin* МО и контрольных МО (рис. 18).

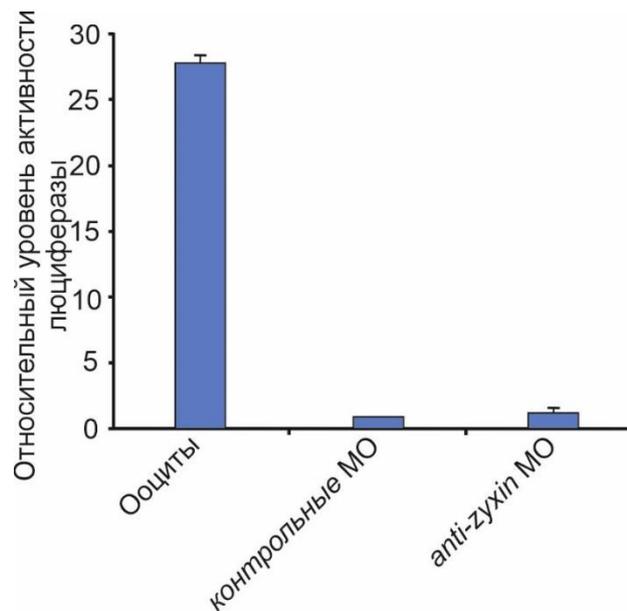


Рис. 18. Изучение активности промотора *pou5f3.3*. Нокадаун *zuxin* не влияет на активность фрагмента промотора (-2523-0 п.н.) *pou5f3.3*, ответственного за его экспрессию во время оогенеза (промотор активен только в ооцитах).

Хотя этот эксперимент дает некоторые указания на то, что *Zuxin* не регулирует транскрипцию *pou5f3.3*, мы не могли исключить того, что некоторые цис-элементы, которые регулируются *Zuxin*, могут находиться вне исследуемого фрагмента промотора *pou5f3.3*. Поскольку этот ген является материнским, т.е. его транскрипты накапливаются во время оогенеза, мы проверили, может ли такое же повышение уровня мРНК *pou5f3.3* 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 контрольным МО. Поскольку мРНК *pou5f3.3* 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 *pou5f3.1*, транскрипция которых начинается после активации эмбрионального генома. Напротив, уровни мРНК *pou5f3.3* в обработанных эмбрионах были значительно выше, чем у контрольных эмбрионов (рис. 19). Другими словами, даже в условиях ингибирования транскрипции мы наблюдали увеличение количества транскриптов *pou5f3.3* в зародышах с нокдауном *zuxin*. Таким образом, мы пришли к выводу, что *Zuxin* регулирует уровни мРНК *pou5f3.3* через контроль ее стабильности, а не за счет активации транскрипции.

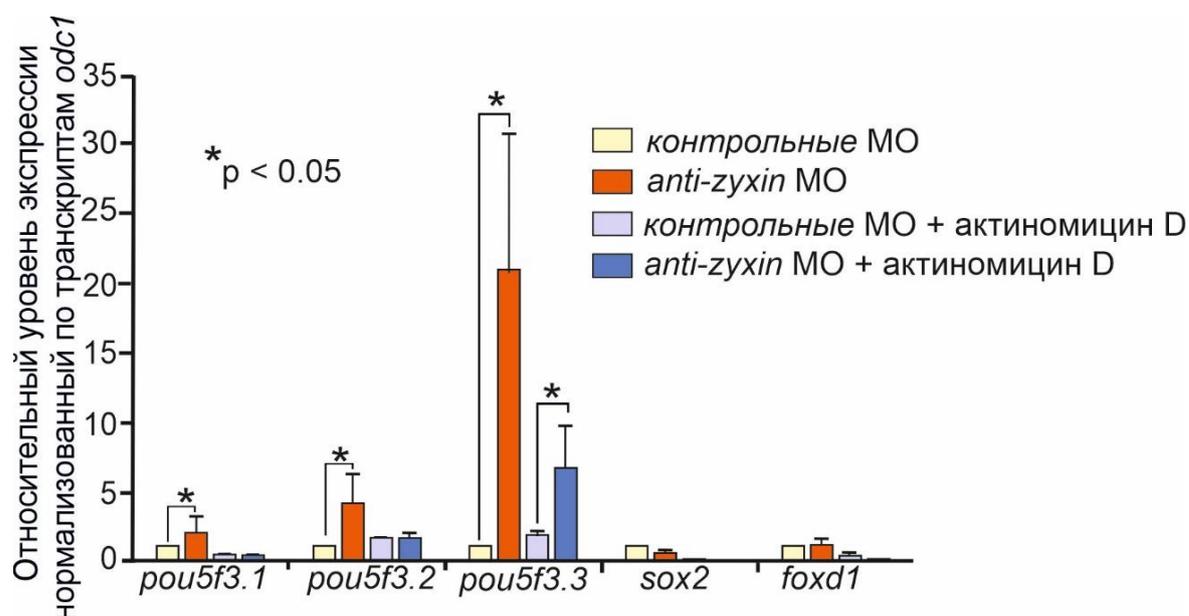


Рис. 19. Влияние нокдауна *zuxin* на материнский ген *pou5f3.3* и зиготические гены *sox2*, *foxd1*, *pou3f3.2* и *pou3f3.1* в условиях транскрипционной блокады актиномицином D. Разница в уровне мРНК *pou5f3.3* в контрольных эмбрионах и при подавлении трансляции *zuxin* сохраняется в условиях блокирования 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.

4.3. *Zuxin* препятствует образованию комплексов между мРНК *pou5f3* и белком *Ybx1*

Затем мы попытались понять механизм, с помощью которого *Zuxin* контролирует стабильность мРНК *pou5f3.3*. Ранее в нашей лаборатории при целенаправленном поиске партнеров *Zuxin* в системе двугибридного дрожжевого скрининга был обнаружен белок *ybx-1*. (Martynova et al., 2013). Этот белок является γ -box транскрипционным фактором, который может образовывать рибонуклеопротеиновый (РНП) комплекс с мРНК, тем самым значительно повышая устойчивость транскриптов к деградации (Sommerville and Ladomey, 1996; Evdokimova et al., 2001). Учитывая это, мы предположили, что *Ybx1* может играть важную роль в молекулярном механизме, с помощью которого *Zuxin* регулирует стабильность мРНК *pou5f3.3* и, вероятно, двух других генов семейства *pou5f3*: *pou5f3.1* и *pou5f3.2*.

Чтобы проверить эту гипотезу, мы сначала подтвердили, что Zuxin может взаимодействовать с Ybx1. В дрожжевой двугибридной системе мы обнаружили взаимодействие между LIM-доменами Zuxin и С-концевым доменом Ybx1 (рис. 20).

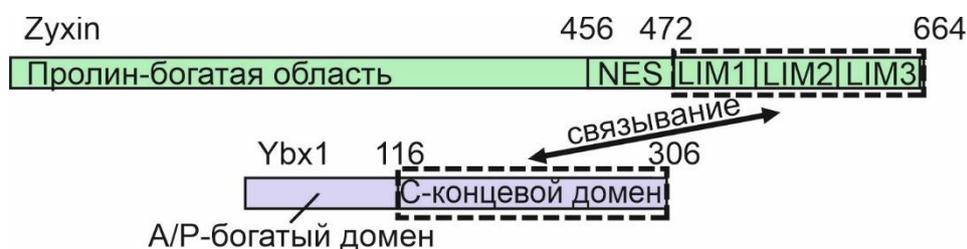


Рис. 20. Схема взаимодействия белков Zuxin и Ybx1. Стрелкой показаны белковые домены, взаимодействие которых было обнаружено в системе двугибридного дрожжевого скрининга.

В настоящей работе мы исследовали специфичность взаимодействия Zuxin 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 Zuxin 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 Zuxin и С-концевым доменом Ybx1 анализировали при помощи anti-flag антител. Как видно на рис. 21 Zuxin и Ybx1 формируют комплекс, взаимодействуя своими С-концевыми участками. Взаимодействие между N-концевым доменом Ybx1 и LIM доменами Zuxin (рис. 21) не было обнаружено.

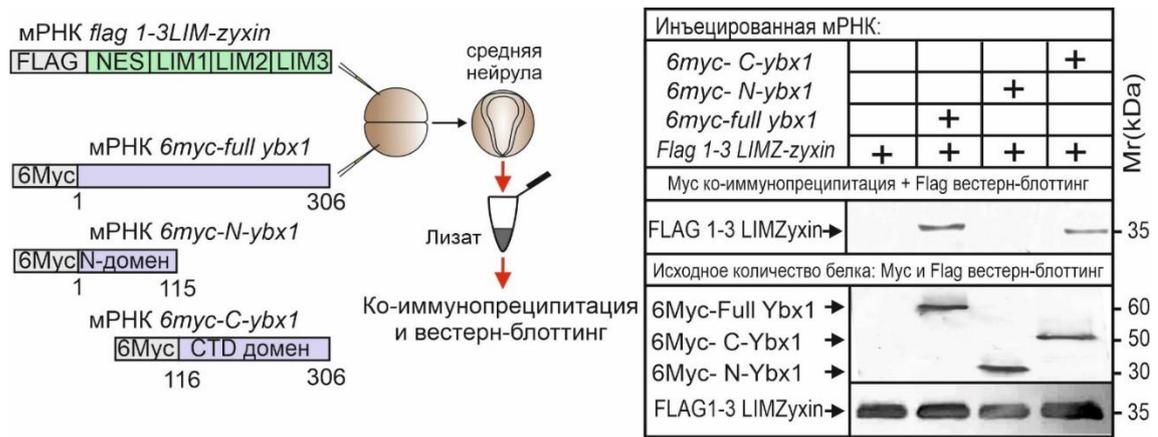


Рис. 21. Ко-иммунопреципитационный анализ связывания LIM-доменов Zyxin с полноразмерным белком Ybx1 и его CTD-доменом в экстрактах эмбрионов *Xenopus*, инъектированных соответствующими мРНК. Слева: схема эксперимента. Справа: результаты ко-иммунопреципитации.

Важно отметить, что эти результаты согласуются с тем фактом, что только LIM-домены Zyxin были способны восстанавливать уровни мРНК *rou5f3* у эмбрионов с нокадауном *zyxin*, в то время как N-концевой домен этого не делал (рис. 22). В этом случае подавление трансляции осуществляли путем микроинъекций *anti-zyxin* splice MO на участок 5588-5613 п.н. (экзон 3, интрон 3) непротранслированной мРНК *zyxin*. Для восстановления нормального уровня белка вместе с MO на стадии двух бластомеров микроинъектировали синтетическую зрелую мРНК *zyxin* или мРНК его N- и C-частей.

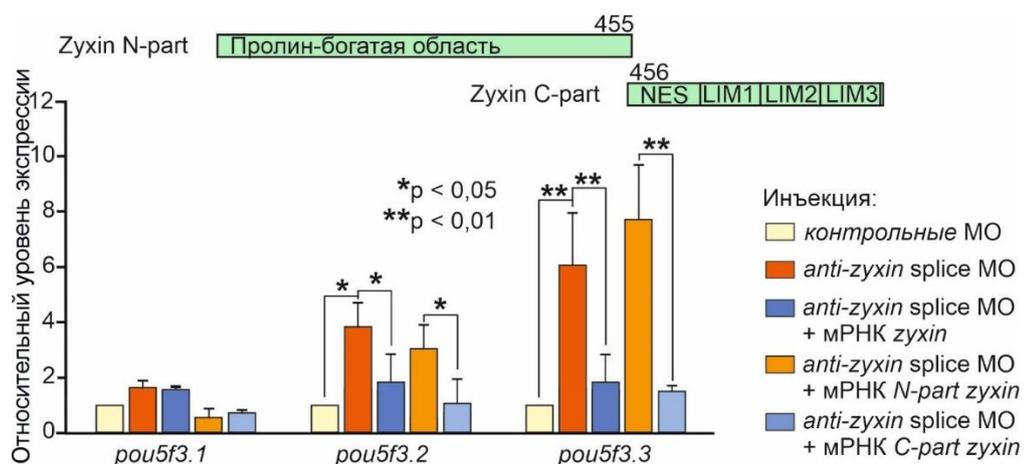


Рис. 22. Только полноразмерный Zyxin и его C-концевой участок восстанавливают нормальный уровень мРНК генов *rou5f3.2* и *rou5f3.3* при ко-инъекции их мРНК с *anti-zyxin* splice MO. Планки погрешностей указывают на стандартные отклонения, полученные в трех независимых экспериментах. * - $p < 0,05$ и ** - $p < 0,01$ 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. 23).

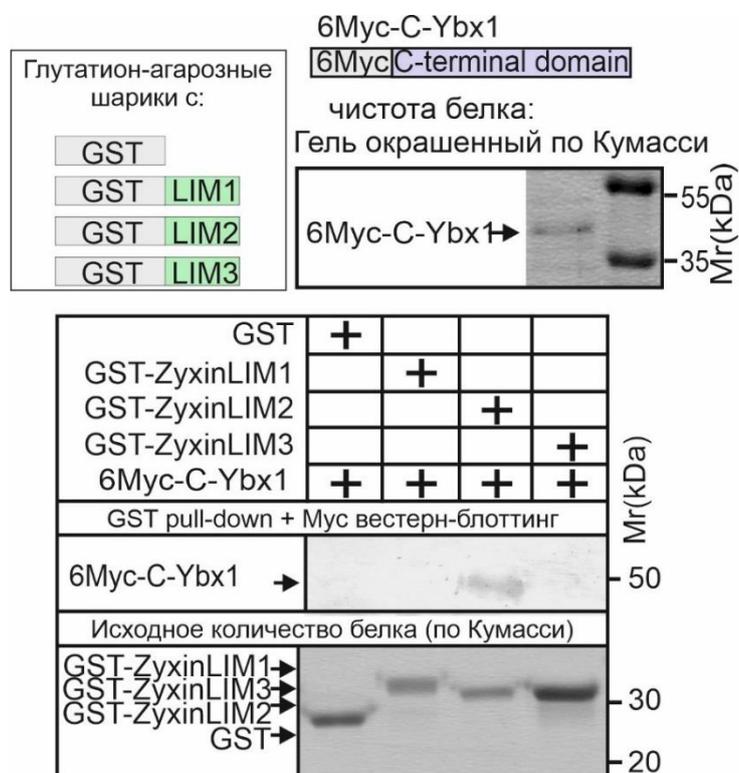


Рис. 23. *In vitro* pulldown анализ взаимодействия 6Myc-C-Ybx1 и отдельных LIM-доменов Zyxin. Вверху: схема белковых конструкторов, которые были использованы в эксперименте. Чистота 6Myc-C-Ybx1, транслированного в эмбрионах *Xenopus laevis* и очищенного из лизатов, показана на геле окрашенном по Кумасси.

Поскольку Ybx1 может перемещаться между клеточным ядром и цитоплазмой (Eliseeva et al., 2011), а Zyxin в основном ко-локализуется с актиновым цитоскелетом и в области клеточных контактов, было интересно посмотреть, может ли Zyxin влиять на распределение Ybx1 между ядром и цитоплазмой. Для этого мы разделили ядерную и цитоплазматическую фракции от эмбрионов, которым инъецировали либо мРНК *btus-ybx1* и *zyxin*, либо только мРНК *btus-ybx1*. Дальнейший анализ распределения Myc-Ybx1 с помощью вестерн-блоттинга показал, что добавление Zyxin снижает концентрацию Ybx1 в ядре, но увеличивает его концентрацию в цитоплазме (рис. 24). Таким образом, Zyxin может взаимодействовать с Ybx1, удерживая его в цитоплазме.

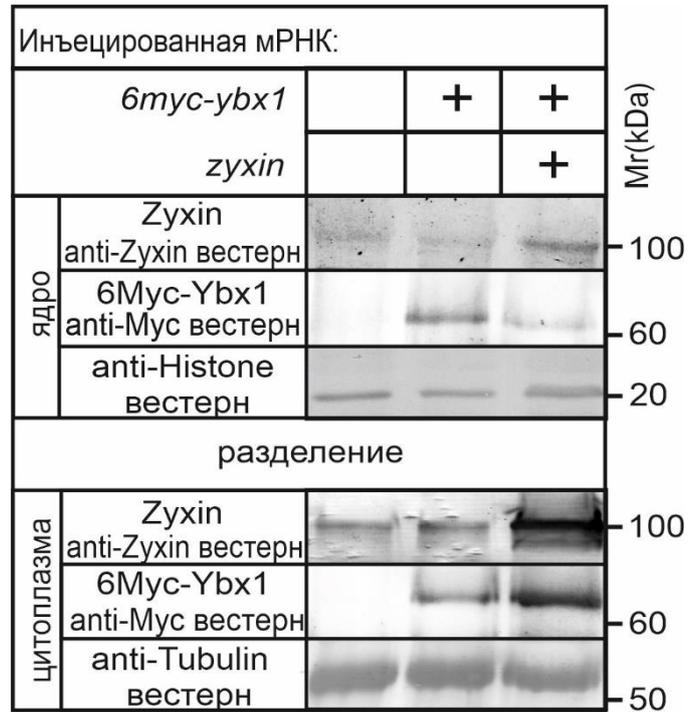


Рис. 24. Анализ распределения белков Zyxin и Ybx1 между ядерной и цитоплазматической фракциями. Zyxin снижал уровень 6Musc-Ybx1 в ядре и повышал уровень 6Musc-Ybx1 в цитоплазме.

Затем мы использовали РНК-иммунопреципитационный анализ (RIP), чтобы проверить, способен ли Ybx1 образовывать комплексы с мРНК *rou5f3* и может ли Zyxin препятствовать образованию этих комплексов. Для этого в эмбрионы на стадии двух бластомеров микроинъекцировали либо мРНК *6musc-ybx1*, либо мРНК *zyxin*. Эмбрионы лизировали на стадии гастрюлы (стадия 11), и сравнивали количество соосажденных на анти-Musc-агарозе мРНК *rou3f3.1*, *rou5f3.2* и *rou5f3.3* после ко-IP с помощью qRT-ПЦР (см. Материалы и методы). Мы наблюдали гораздо более высокое обогащение мРНК *rou3f3.1*, *rou5f3.2* и *rou5f3.3* в образцах с коэкспрессированным 6Musc-Ybx1, чем в контрольных образцах, в которых коэкспрессировался 6Musc-Chordin (рис. 25). Напротив, значительное снижение уровней мРНК *rou5f3.1*, *rou5f3.2* и *rou5f3.3* наблюдалось в образцах, в которых 6Musc-Ybx1 коэкспрессировался с Zyxin. Таким образом, мы пришли к выводу, что Ybx1 действительно может формировать комплекс с мРНК *rou5f3* и что Zyxin может препятствовать образованию этого комплекса (рис. 25).

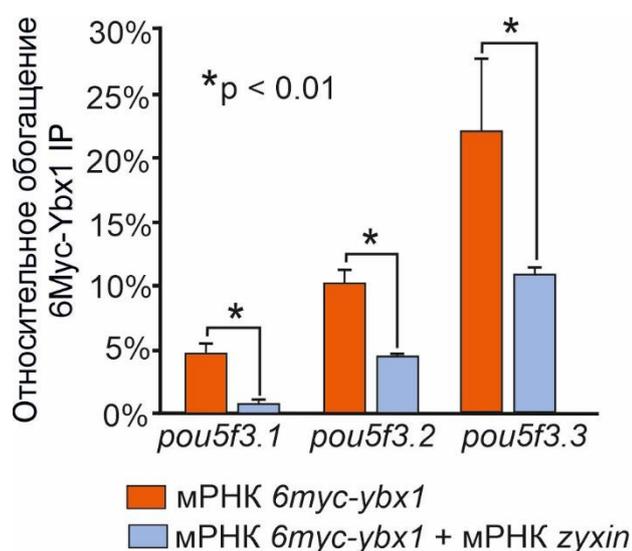


Рис. 25. Данные RIP указывают на способность Ybx1 связывать мРНК *pou5f3.1-3*. Zyxin уменьшает эту способность.

4.4. Оверэкспрессия *ybx1* и задержка Zyxin в клеточном ядре увеличивает уровни мРНК *pou5f3*.

Для последующего изучения эффектов Ybx1 на стабильность мРНК *pou5f3* 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 *pou5f3* на стадии ранней нейрулы. Противоположный эффект наблюдался, когда трансляция эндогенной мРНК *ybx1* блокировалась инъекцией *anti-ybx1* МО (рис. 26).

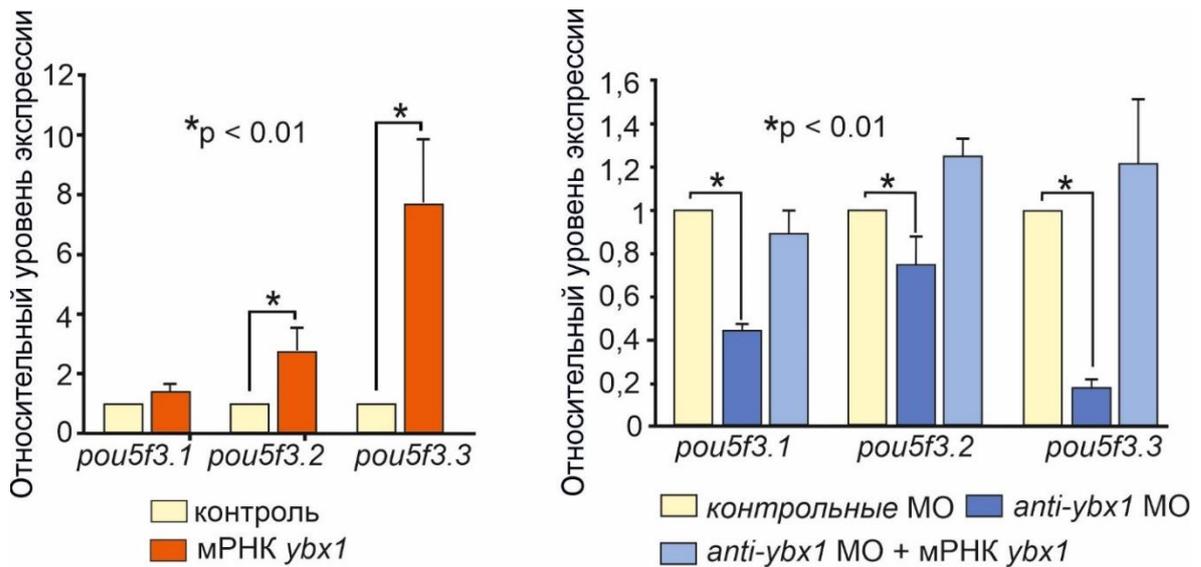


Рис. 26. Оверэкспрессия *ybx1* способствует увеличению уровней транскриптов генов семейства *rou5f3*. Подавление трансляции мРНК *ybx1* снижает уровни мРНК *rou5f3*. Восстановление нормального уровня мРНК этих генов происходит в результате восстановления нормальной экспрессии *ybx1*.

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 неинъектированная сторона при этом служила контролем) увеличивала уровни мРНК *rou5f3.3*, как при инъекции *anti-zuxin* МО (рис. 27 с рис. 12). 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. 27).

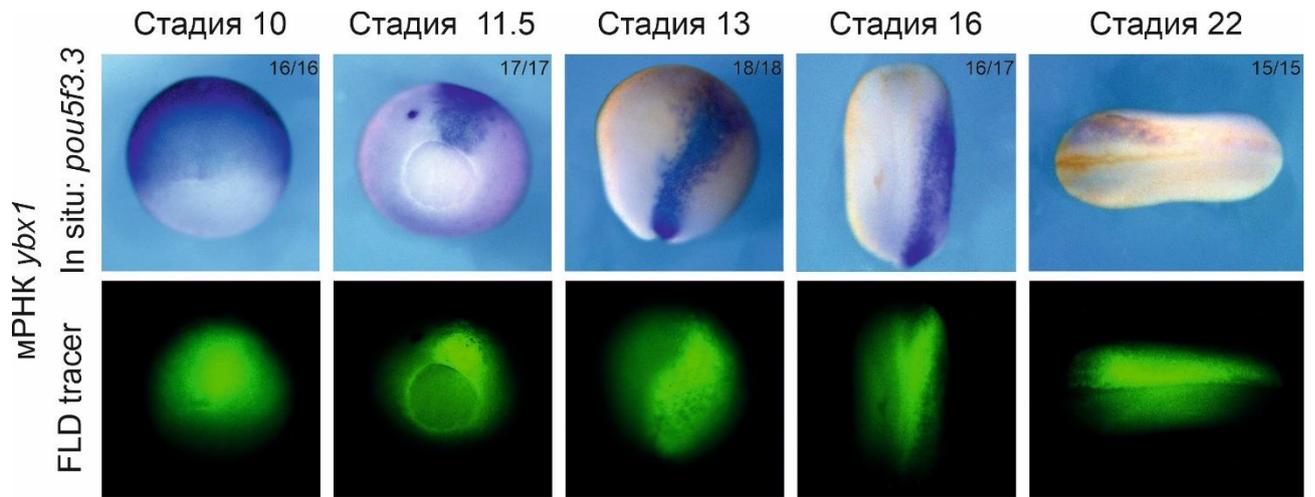


Рис. 27. Гибридизация *in situ* на мРНК *pou5f3.3* после инъекции мРНК *ybx-1* показала, что оверэкспрессия *ybx1* увеличивает уровни мРНК *pou5f3.3*, что аналогично эффектам инъекции *anti-zuxin* МО. Доля эмбрионов, показывающих проиллюстрированный паттерн экспрессии среди всего исследованных эмбрионов 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 (Eliseeva et al., 2011), мы провели анализ активности промоторной области (-2523-0) *pou5f3.3* при оверэкспрессии Ybx1. Мы не наблюдали каких-либо различий в активности промотора *pou5f3.3* у эмбрионов, оверэкспрессирующих Ybx1, по сравнению с контрольными эмбрионами, что указывает на то, что Ybx1 не может влиять на транскрипцию *pou5f3.3*, но, по-видимому, регулирует только стабильность его мРНК (рис. 28).

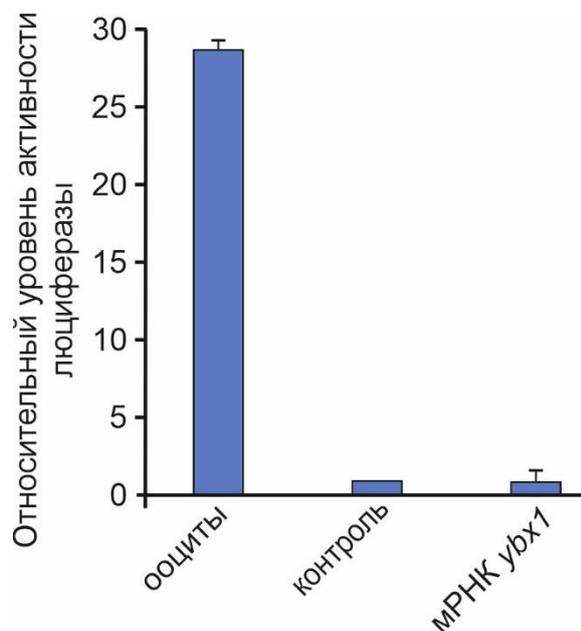


Рис. 28. Изучение активности промотора *rou5f3.3*. Оверэкспрессия *ubx1* не влияет на активность фрагмента промотора (-2523-0 п.н.) *rou5f3.3*.

Наконец, чтобы проверить влияние истощения цитоплазматического Zyxin на уровни мРНК *rou5f3*, мы поставили эксперимент, в котором количество Zyxin 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 Zyxin (Nix et al., 2001). Логика этого эксперимента заключалась в том, что если взаимодействие между Zyxin и Ybx1 происходит в цитоплазме, обработка эмбрионов лептомицином В должна снижать концентрации Zyxin в цитоплазме, повышать уровни свободного Ybx1 и, таким образом, увеличивать количество транскриптов *rou5f3*. Действительно, как и в случае нокдауна Zyxin *anti-zyxin* MO, мы наблюдали увеличение концентраций мРНК всех трех генов *rou5f3* у эмбрионов, обработанных лептомицином В (рис. 29).

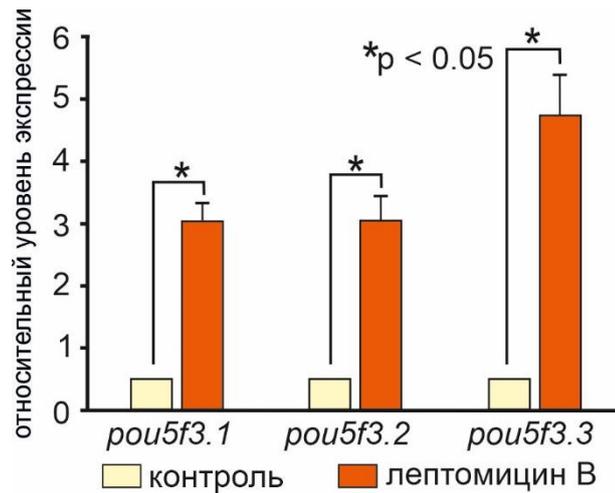


Рис. 29. Инкубация зародышей *Xenopus laevis* в 0.1 мкг/мл лептомицина В до стадии гастрюлы увеличивает количество транскриптов генов семейства *rou5f3*.

4.5. 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, которое 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 так же, по данным литературы, мРНК другого ключевого регулятора плюрипотентности *NANOG* в клетках млекопитающих (Guo et al., 2017; Guo et al., 2016). Вполне вероятно то, что он способен связывать мРНК других генов-регуляторов плюрипотентности *klf4*, *sox2*, *vent2.1* и *vent2.1*. 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 β мус- Υ bx1 образует комплексы с мРНК *vent2.1*, *vent2.2* и *sox2*, но не связывает мРНК *klf4*. Интересно, что коэкспрессия β мус- Υ bx1 и *Zyxin* по-разному влияет на стабильность комплексов с РНК: если в случае с мРНК генов семейства *pou5f3*, *Zyxin* дестабилизирует взаимодействие, то для мРНК *sox2*, *vent2.1* и *vent2.2* мы наблюдали обратный эффект – добавление *Zyxin* стабилизировало связывание (рис. 30)

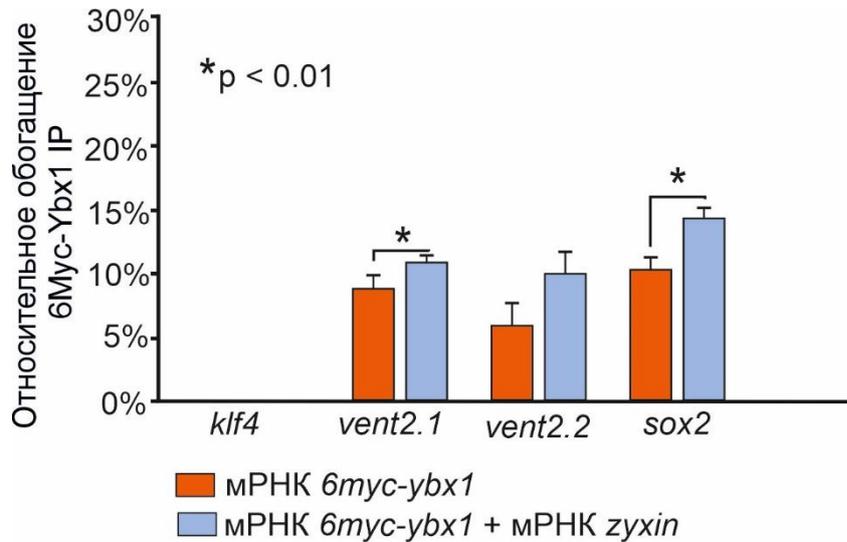


Рис. 30. RIP мРНК генов плюрипотентности с белком Υ bx1

Основываясь на полученных данных, можно утверждать, что увеличение количества транскриптов *klf4* при нокдауне *zyxin* не за счет образования комплекса с белком Υ bx1. Также если учитывать, что *Zyxin* стабилизирует комплекс Υ bx1 с мРНК *vent2.1* и *vent2.2*, маловероятным кажется вклад Υ bx1 в увеличение количества их транскриптов при нокдауне *zyxin*.

Исходя из данных о том, что *pou5f3.3* транскрибируется только в оогенезе, а его белковый продукт поддерживает недифференцированное состояние клеток, очевидно, что деградация мРНК и соответственно уменьшение количества белка *pou5f3.3*, необходимо для нормального протекания процессов дифференцировки и эмбрионального развития.

Чтобы оценить важность деградации *pou5f3.3* для дальнейшего развития мы оверэкспрессировали Мус-тагированный *pou5f3.3*. Для этого мы

микроинъекцировали синтетическую мРНК *btus-pou5f3* 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. 31).



Рис. 31. Оверэкспрессия *pou5f3.3* вызывает дефекты развития *Xenopus laevis*.

Чтобы исследовать какие изменения происходят на молекулярном уровне, мы проверили экспрессию мРНК основных регуляторов плюрипотентности и дифференцировки при оверэкспрессии *pou5f3.3*. Зародыши, микроинъекцированные *btus-pou5f3.3* мРНК, собирали на стадии ранней нейрулы (стадия 13), когда в нормальном развитии происходит уменьшение количества транскриптов *pou5f3.3*, и проводили анализ экспрессии выбранных генов методом qRT-PCR.

Полученные данные указывают на то, что оверэкспрессия фактора *pou5f3.3* 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 *pou5f3.2*.

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 (Cao, 2015, Dolle, 2009). Также незначительно менялась экспрессия еще одного гена семейства Pou5f3 - *pou5f3.1*.

Кроме того, мы наблюдали значительное подавление экспрессии генов, активно уже после гаструляции и ответственных за дифференцировку. Так, в зародышах с оверэкспрессией *pou5f3.3* 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*, *zuxin*, *ldb3*. Также падал уровень экспрессии генов семейства AGR, регулирующих регенерацию и дифференцировку клеток раневой бластемы и участвующих в развитии головных структур – *ag1/2* и *agr2* (Tereshina et al., 2014, Ivanova et al., 2013) (рис. 32).

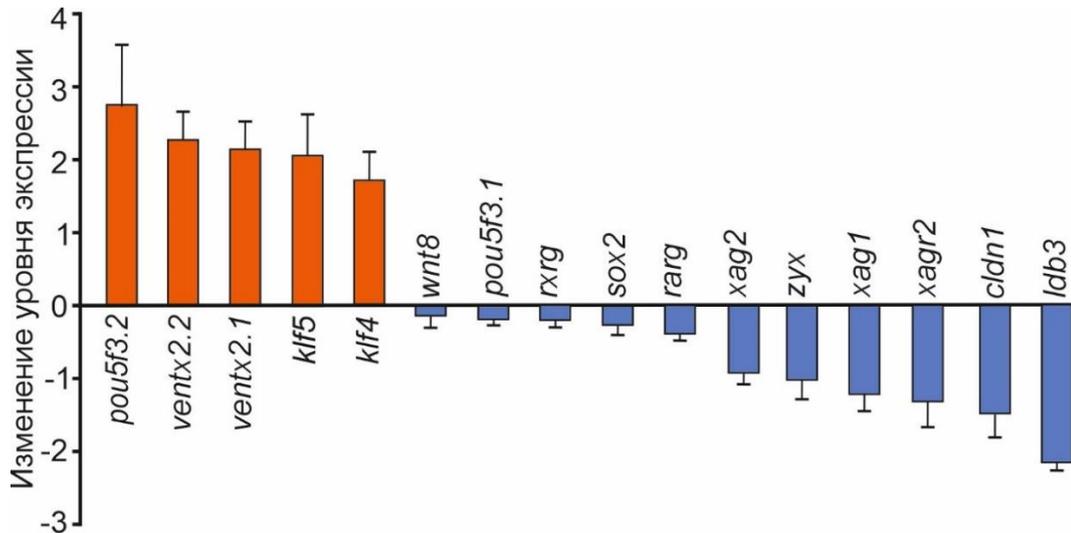


Рис. 32. Оверэкспрессия *pou5f3.3* влияет на экспрессию генов, регулирующих плюрипотентность и дифференцировку. Данные получены с помощью метода qRT-PCR и представлены в виде кратного изменения экспрессии генов. Уровни транскрипции генов домашнего хозяйства *odc* и *efa* использовали для нормализации. Пределы погрешностей показывают стандартное отклонение.

4.6. 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 *pou5f3*, что стимулирует деградацию этих мРНК. Между тем, другие авторы ранее обнаружили, что у млекопитающих *Ybx1* может связывать мРНК другого гена плюрипотентности, *NANOG* (Guo et al., 2016). 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* (Guo et al., 2016). 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 гаструляции 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 33) (Schuff et al., 2012). Концентрации транскриптов *pou5f3* и *klf4* также увеличиваются у эмбрионов *Danio* с нокадауном *zyxin*, но в меньшей степени (рис. 33).

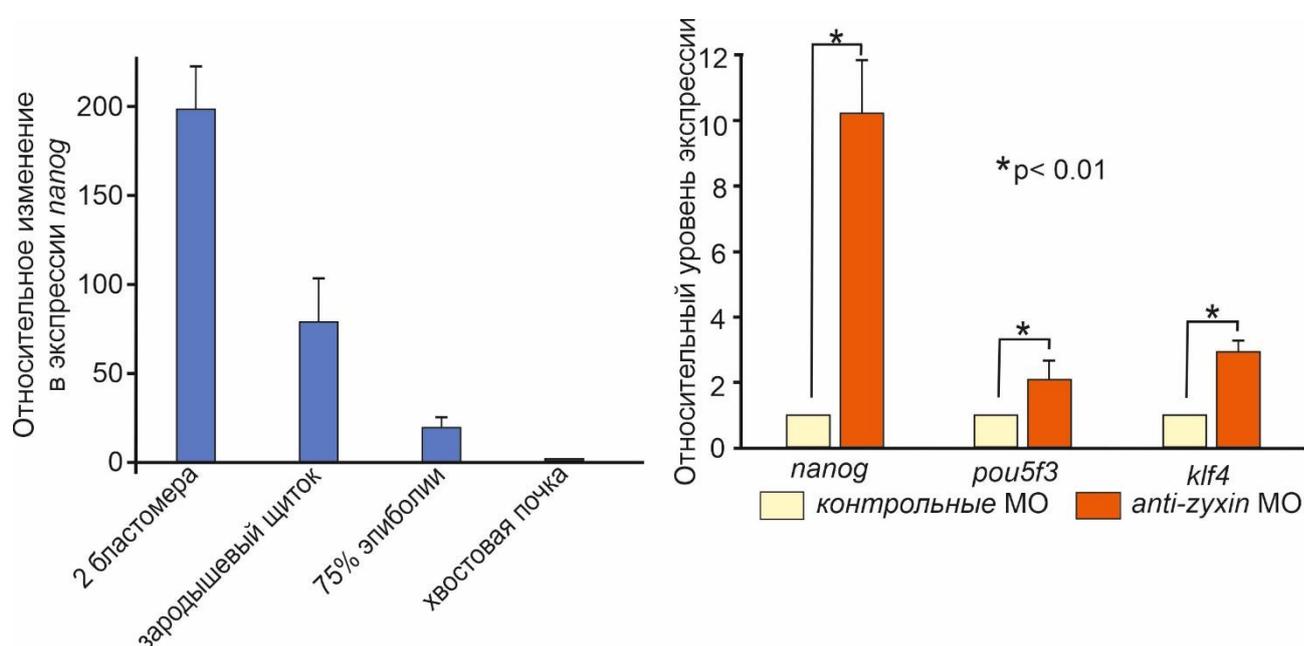


Рис. 33. Экспрессия генов плюрипотентности у эмбрионов *Danio rerio*. Слева: временной профиль экспрессии *nanog* у эмбрионов *Danio rerio*. Справа: данные по экспрессии в зародышах на стадии хвостовой почки с нокадауном *zyxin*, опосредованным инъекцией 0,3 мМ МО.

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 иммунофлуоресцентного окрашивания, иммуноблот-анализа с использованием антител к ZYXIN и секвенирования ДНК (рис. 34, 35).

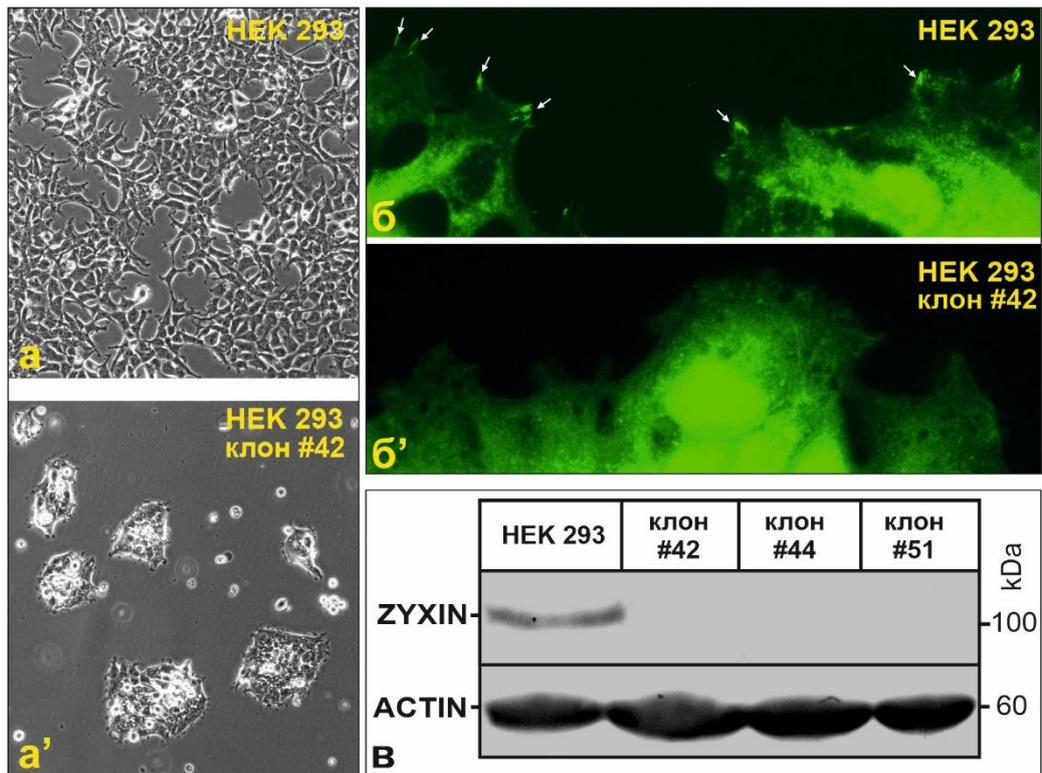


Рис. 34. Результаты нокаута ZYXIN в клетках линии HEK293. а и а' Фенотип контрольных клеток HEK293 и клеток нокаутных по ZYXIN. б и б' Результаты иммуногистохимического окрашивания с антителами к ZYXIN клеток HEK293 с нормальными адгезивными комплексами (стрелки указывают накопление ZYXIN) и клеток с 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.
PAM-сайты отмечены красным

CCACCTCCSCTTGCSTGGGGATGGCGACGATGCAGAGGGTGCSTCTGGGAGGTGCSTTCCCG
P P P L A G D G D D A E G A L G G A F P
CCGCCCCCTCCSCTCGATCGAGGAATCATTTCCSCTGCGCCTCTGGAGGAGATCTTC ЭКЗОН 2
P P P P P I E E S F P P A P L E E E I F
CCTTCCSCTCGSCTTCTCCGGAGGAGGAGGGAGGGCCTGAGGCCSCTATACCGCCCCA
P S P P P P P E E E G G P E A P I P P P
CCACAGgtacggaggcctgggagggggcggtgactggacacccccaaggagaggagaag
P Q
интрон 2 agggccctttcttcttacctccctgacacctgctctgggggtgggggatagaggcat
ggaataggtgctctgacctctgacctctagCCCAGGGAGAAGGTGAGCAGTATTGATTT
P R E K V S S I D L
GGAGATCGACTCTCTGTCTCACTGCTGGATGACATGACCAAGAATGATCTTTCAAAGC 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 aactaaggaggatggtgtcctcctgactgcatctctcttccctctccacccttgcagG
TGTCATCTGGATATGTGCCCCACCAGTGGCCTCCATTCAGTTCCAAGTCCAGTACCA ЭКЗОН 4
V S S G Y V P P P V A T P F S S K S S T
AGCCTGCAGCCGGGGCACAGCACCCTGCCTCTTGGAAAGTCCCCT
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, PAM-сайты - красные, сайты gRNA подчеркнуты, делеции - пунктир, инсерции - черные, стоп-кодон - голубой	Δ п.н.	% мутаций
Делеции в ZYXIN в клоне # 42		
TCCCGCCGCCCCCTCCSCTCGATCGAGGAATCATTTCCSCTGCGCCTCTGGAGGAGG	0	6
TCCCGCCGCCCCCTCCSCTCGATCGAGGAATCATTTCCSCTGCGC-CTGGAGGAGG	-1	24
TCCCGCCGCCCCCTCCSCTCGATCGAGGAATCATTTCCSCT----CTGGAGGAGG	-4	27
TCCCGCCGCCCCCTCCSCTCGATCGAGGAATCATTTCC-----CTGGAGGAGG	-8	43
Делеции в ZYXIN в клоне # 44		
TCCCGCCGCCCCCTCCSCTCGATCGAGGAATCATTTCCSCTGCGCCTCTGGAGGAGG	0	10
TCCCGCCGCCCCCTCCSCTCGATCGAGGAATCATTTCCSCTGCG-CTGGAGGAGG	-1	1
TCCCGCCGCCCCCTCCSCTCGATCGAGGAATCATTTCCSCT----CTGGAGGAGG	-4	1
TCCCGCCGCCCCCTCCSCTCGATCGAGGAATCATTTCC-----CTGGAGGAGG	-8	2
Инсерция 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 GTTGGACACAACCTGCGCGCAGAGCTGGAGCTCCGCGGTGTGGAAGTACAGAATGAA V G H N C A Q S W S S A G V E V Q N E GCAGGGAAGGCTAATAAAGTTTGGCAAGACATCACA TAGCAAACACCCTCTCC A G K R L I K F C Q D I T - Q T P S S AACAACACAGAGAAGACTTACACATGGACATCACTCTGGAGGAGAGATCTCCCT 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		
CCTCTCCACCCTTGCAGGTGTCATCTGGATATGTGCCCCACCAGTGGCCACTCC	0	3
CCTCTCCACCCTTGCAGGTGTCATCTGGATATGTGCCCC-CCAGTGGCCACTCC	-1	48
CCTCTCCACCCTTGCAGGTGTCATCTGGATATGC-----CAGTGGCCACTCC	-8	49

B

Рис. 35. 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. 36), что также наблюдалось у эмбрионов *Danio rerio* с нокадаунм *zuxin*. Более слабое увеличение экспрессии было обнаружено в случае мРНК *KLF4* и *POU5F1 / OCT4*.

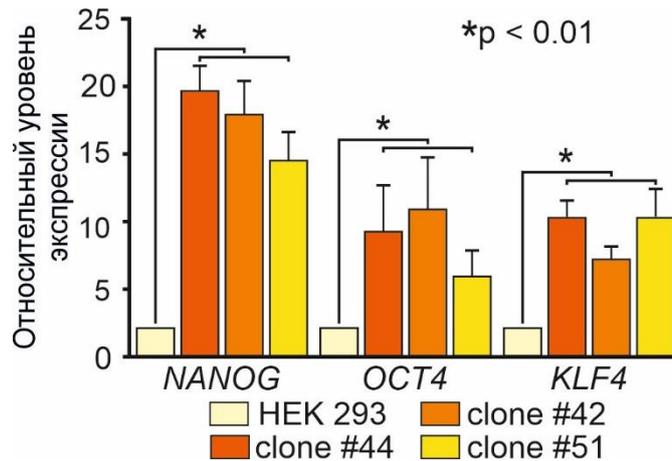


Рис. 36. Регулирование уровней транскриптов генов плюрипотентности в клетках HEK293 человека с помощью *ZYXIN*. Данные qRT-PCR на стабильных клонах 42, 44 и 51 клеточной линии *ZYXIN*-КО HEK293.

5. ОБСУЖДЕНИЕ

В этой работе мы впервые продемонстрировали, что цитоскелетный белок *Zuxin* 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 *Zuxin* уменьшает концентрацию мРНК генов семейства *pou5f3* за счет образования комплекса с мРНК-связывающим белком *Ybx1*, который, находясь вне этого комплекса, стабилизирует мРНК *pou5f3*.

Несколько доказательств подтверждают описанный механизм:

(1) Мы показали с помощью нескольких методов, что нокдаун *Zuxin* приводит к значительному снижению концентрации мРНК генов семейства *pou5f3*, особенно мРНК *pou5f3.3*, во время ранних этапов эмбрионального развития.

(2) Используя двугибридную дрожжевую систему скрининга и ко-иммунопреципитационный анализ, мы показали, что LIM-доменная область *Zuxin* может связываться с С-концевой областью *Ybx1*. Кроме того, мы подтвердили, что *Zuxin* может удерживать *Ybx1* в цитоплазме, предотвращая его транслокацию в ядро.

(3) Методом РНК-иммунопреципитации, мы показали, что *Ybx1* может связывать мРНК *pou5f3*, и что добавление *Zuxin* значительно снижает соосаждение транскриптов *pou5f3*.

(4) Мы продемонстрировали с помощью qRT-PCR и гибридизации *in situ*, что оверэкспрессия *Ybx1* значительно увеличивает уровни транскриптов *pou5f3*, в то время как подавление *ybx1* антисмысловым МО имеет противоположный эффект.

(5) Мы показали, что нокдаун *zuxin* в эмбрионах *Danio rerio* и нокаут *ZYXIN* в клетках человека HEK293 приводит к увеличению количества транскриптов *NANOG*

На основании этих данных мы создали модель регуляции стабильности мРНК *pou5f3* с помощью Zyxin (рис. 37)

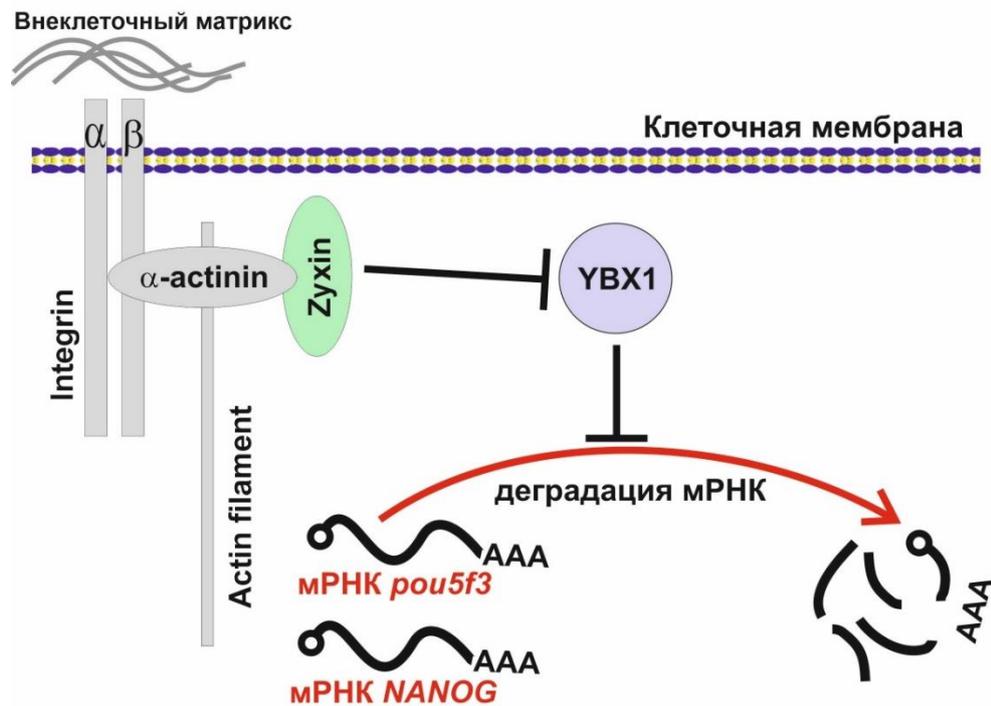


Рис. 37. Модель участия Zyxin в регуляции стабильности мРНК.

Согласно этой модели, можно предположить, что на ранних стадиях развития *Xenopus laevis*, когда количество этого белка сравнительно невелико (Martynova et al., 2013), Zyxin не препятствует связыванию Ybx1 с мРНК *pou5f3*. Однако, когда его концентрация начинает увеличиваться после активации транскрипции собственного генома зародыша (Martynova et al., 2013), 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 (Guo et al., 2017; Guo et al., 2016). 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*.

Недавно было показано, что *Ybx1* может увеличивать уровни мРНК *NANOG* не только за счет ее связывания и стабилизации, но также в следствие прямой активации транскрипции гена *NANOG* в ядре клетки (Guo et al., 2016). Поскольку *ZYXIN* может как препятствовать связыванию *Ybx1* с мРНК-мишенью, так и удерживать *Ybx1* в цитоплазме, оба описанных в литературе механизма, с помощью которых *Ybx1* увеличивает концентрацию мРНК *NANOG*, могут быть ответственны за наблюдаемое повышение уровней этой мРНК в наших экспериментах с нокдауном *ZYXIN* на эмбрионах *Danio rerio* и клетках HEK293. Однако необходимы дальнейшие эксперименты, чтобы определить индивидуальный вклад каждого из этих потенциальных механизмов в процесс регуляции экспрессии *NANOG*.

Интересно, что ранее в нашей лаборатории было показано, что *Zyxin* может связывать и удерживать в цитоплазме гомеодоменный регулятора ранней спецификации переднего мозга *Anf / Hesx1*, и, таким образом, предотвращать его транскрипционную активность, а также предотвращать активность эффектора *Sonic hedgehog*, фактора транскрипции *Gli1* (Martynova et al., 2013). Обнаруженная в настоящей работе способность *Zyxin* связывать и регулировать активность *Ybx1* расширяет список белков-мишеней, функции которых регулируются этим цитоскелетным белком.

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*. Открытым оставался вопрос, основан ли механизм, за счет которого подавление *zyxin*

активирует эти гены, на связывании Ybx1 с мРНК или на стимуляции трансляционной активности этих генов повышенными концентрациями *rou5f3*.

Мы показали, что оверэкспрессия *rou5f3.3* ведет к активации экспрессии генов плюрипотентности *rou5f3.2*, *klf4*, *klf5*, *vent2.2*, *vent2.1*. Их уровень экспрессии определяет нормальное эмбриональное развитие, в частности, очень важен на начальных этапах дифференцировки при гастрюляции, когда формируются зародышевые листки. В момент, когда клетки начинают дифференцироваться, необходимо сохранение баланса между плюрипотентным и дифференцированным состоянием, и только когда все клетки определили свою судьбу и готовы к образованию различных типов тканей, можно запустить программу дифференцировки. Мы предполагаем, что материнский фактор *rou5f3.3*, присутствующий в эмбрионе на самых ранних стадиях развития, осуществляет эту селекцию - разрешает экспрессию генов плюрипотентности, в то же время, подавляя экспрессию генов-регуляторов дифференцировки. В первую очередь, мишенью этого фактора является принадлежащий к тому же семейству ген *rou5f3.2*, экспрессия которого активируется в ходе гастрюляции. С другой стороны, имеющиеся в литературе данные об активации транскрипции гена *rou5f3.1* белком Pou5f3.3 (Exner et al., 2017) не подтвердились в нашей работе. Вероятно, в активации экспрессии этого гена участвует набор факторов семейства POU5: изначально Pou5f3.3 запускает транскрипцию *rou5f3.2*, в свою очередь фактор Pou5f3.2 или комбинация этих факторов активирует экспрессию *rou5f3.1*, который является зиготическим фактором. Важно заметить, что наличие всех трех факторов семейства POU5 соответствует в развитии и поддержании плюрипотентного статуса клеток фактору OCT4 млекопитающих (Venkatarama et al., 2010; Morrison et al., 2006).

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. Было обнаружено, что Pou5f1 активирует экспрессию гена *klf4* на уровне транскрипции у *Danio rerio* (Onichtchouk et al.,

2010; Kotkamp et al., 2014), а Pou5f3.2 может напрямую связывать и повышать экспрессию *vent2b* (Cao et al., 2004). Более того, Klf4, который возрастает при оверэкспрессии *pou5f3 / stat3*, может активировать экспрессию *nanog* у японской камбалы (Sun et al.2019).

Также интересны полученные в этой работе данные об ингибировании экспрессии генов, участвующих в клеточной адгезии: *actin*, *claudin*, *zyxin*, *ldb3*, и генов, регулирующих раннее развитие мозга и регенерацию *agl/2* и *agr* белком Pou5f3.3.

В других работах было показано, что на экспрессию генов клеточной адгезии могут влиять два других фактора семейства POU5. Важно отметить, что регулирование адгезии происходит не только на уровне транскрипции, но и на посттрансляционном уровне – за счет их взаимодействий с факторами транскрипции (Livigni et al., 2013). В процессе дальнейших исследований необходимо выяснить, какие механизмы ответственны за эффекты ингибирования экспрессии этих генов белком Pou5f3.3.

Независимо от результатов работ, указывающих на возможный перекрестный регуляторный механизм активации *nanog*, *klf4* и *vents* у эмбрионов с оверэкспрессией *pou5f3*, 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*.

Интересно, что снижение концентраций мРНК *pou5f3* и *nanog* у эмбрионов *Xenopus* и *Danio* в ходе нормального развития, сопровождающееся примерно одновременным увеличением содержания Zyxin, совпадает с началом интенсивных морфогенетических движений мезодермальных и эктодермальных клеток во время гаструляции и нейруляции (Sokol, 2016; Eroshkin and Zeraisky, 2017). Учитывая, что морфогенетические движения связаны со сборкой актиновых филаментов и формированием клеточных контактов, и что Zyxin является одним из ключевых игроков в этих процессах, морфогенетические

движения могут дополнительно предотвращать взаимодействие мРНК *pou5f3* с *Ybx1*, втягивая его вместе с *Zuxin* в клеточные контакты. Косвенно это предположение подтверждается способностью *Zuxin* удерживать *Ybx1* в цитоплазме. Это может означать, что морфогенетические движения играют роль регуляторных факторов, которые ограничивают плюрипотентность клеток, тем самым стимулируя клетки к дифференцировке. Таким образом, удивительный механизм, который связывает морфогенез с дифференцировкой клеток, может быть реализован с помощью *Zuxin*.

6. ВЫВОДЫ

1. Подавление трансляции белка *Zuxin* приводит к увеличению уровня мРНК фактора плюрипотентности *rou5f3.3* 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 *rou5f3.3*
3. При общем подавлении транскрипции сохраняется увеличение количества транскриптов *rou5f3.3*, что может быть связано с уменьшением уровня деградации мРНК
4. Уровень деградации мРНК генов семейства *rou5f3* 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 *rou5f3.3*.
6. При нокадауне *zuxin* у эмбрионов *Danio rerio* наблюдается увеличение количества мРНК генов-регуляторов плюрипотентности (*nanog*, *rou5f3*, *klf4*), нокаут *ZYXIN* в клетках линии НЕК293 приводит к тому же результату – увеличивается количество транскриптов генов *NANOG*, *OCT4*, *KLF4*.

7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БСА - бычий сывороточный альбумин

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК – комплементарная ДНК

мМ- миллимоль

мин. - минута

мкг -микрограмм

мкл- микролитр

мл- миллилитр

мм- миллиметр

МО - Морфолиновый олионуклеотид

мРНК – матричная РНК

нг- нанограмм

об/мин – обороты в минуту

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РНК –рибонуклеиновая кислота

сек. – секунда

ст. – стадия развития

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

BMP - bone morphogenic protein

CRS – cytoplasmic retention site

CSD – cold shock domain, домен холодного шока

CTD - C-terminal domain, С-концевой домен

Da – дальтон

ES-клетки – эмбриональные стволовые клетки

FGF - Fibroblast growth factor

FLD - Fluorescein lysinated dextran

FLD - Fluorescein lysinated dextran

MBT - midblastula transition, среднебластуляционный переход

mRNP – рибонуклеопротеин NES - nuclear export signal, сигнал экспорта из ядра

NES - nuclear export signal, сигнал экспорта из ядра

NGS - next generation sequencing, секвенирование нового поколения

NLS - nuclear localization signal, сигнал ядерной локализации

qRT-PCR - quantitative reverse transcriptase PCR, количественная ПЦР в реальном времени

RIP - RNA immunoprecipitation

UTR – untranslated region, нетранслируемая область

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ateshian G.A., Humphrey J.D. Continuum mixture models of biological growth and remodeling: past successes and future opportunities // *Annual review of biomedical engineering*. 2012. V. 14. P. 97–111.
2. Bachvarova R.F., Masi T., Drum M., Parker N., Mason K., Patient R., Johnson A.D. Gene expression in the axolotl germ line: *Axdazl*, *Axvh*, *Axocst-4*, and *Axkit* // *Dev Dyn*. 2004. V. 231. P. 871–880.
3. Bader A. G., Felts K. A., Jiang N., Chang H. W., Vogt, P. K. Y box-binding protein 1 induces resistance to oncogenic transformation by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100 P. 12384-12389.
4. Bazzini A.A., Del Viso F., Moreno-Mateos M.A., Johnstone T.G., Vejnar C.E., Qin Y., Yao J., Khokha M.K., Giraldez A.J. Codon identity regulates mRNA stability and translation efficiency during the maternal-to-zygotic transition // *EMBO J*. 2016. V. 35(19). P. 2087-2103.
5. Beckerle M.C. Zyxin: zinc fingers at sites of cell adhesion // *Bioessays*. 1997. V. 19(11). P. 949-957.
6. Bouvet P., Matsumoto K., Wolffe A.P. Sequence-specific RNA recognition by the *Xenopus* Y-box proteins. An essential role for the cold shock domain // *J Biol Chem*. 1995. V. 270(47). P. 28297-28303.
7. Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., Johnstone S.E., Levine S.S., Zucker J.P., Guenther M.G., Kumar R.M., Murray H.L., Jenner R.G., Gifford D.K., Melton D.A., Jaenisch R., Young R.A. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells // *Cell*. 2005. V. 122. P. 947–956.
8. Burgess S., Reim G., Chen W., Hopkins N., Brand M. The zebrafish *spiel-ohne-grenzen* (*spg*) gene encodes the POU domain protein *Pou2* related to mammalian *Oct4* and is essential for formation of the midbrain and hindbrain, and for pre-gastrula morphogenesis // *Development*. 2002. V. 129(4). P.905-916.
9. Bushati N., Stark A., Brennecke J., Cohen S.M. Temporal reciprocity of miRNAs and their targets during the maternal-to-zygotic transition in

- Drosophila* // *Curr Biol.* 2008. V. 18(7). P. 501-506.
10. Call G.S., Chung J.Y., Davis J.A., Price B.D., Primavera T.S., Thomson N.C., Wagner M.V., Hansen M.D. Zyxin phosphorylation at serine 142 modulates the zyxin head-tail interaction to alter cell-cell adhesion // *Biochem Biophys Res Commun.* 2011. V. 404(3). P. 780-784
 11. Canon S., Herranz C., Manzanares M. Germ cell restricted expression of chick *Nanog* // *Dev Dyn.* 2006. V. 235. P. 2889–2894.
 12. Cao Q., Zhang X., Lu L., Yang L., Gao J., Gao Y., Ma H., Cao Y. *Klf4* is required for germ-layer differentiation and body axis patterning during *Xenopus* embryogenesis // *Development.* 2012. V.139. P. 3950–3961.
 13. Cao Y., Knochel S., Donow C., Miethe J., Kaufmann E., Knochel W. The POU factor Oct-25 regulates the *Xvent-2B* gene and counteracts terminal differentiation in *Xenopus* embryos // *The Journal of Biological Chemistry.* 2004. V. 279. P. 43735–43743.
 14. Cao Y., Siegel D., Donow C., Knöchel S., Yuan L., Knöchel W. POU-V factors antagonize maternal VegT activity and b-Catenin signaling in *Xenopus* embryos // *The EMBO Journal.* 2007. V. 26. P. 2942–2954.
 15. Cao Y., Siegel D., Knöchel W. *Xenopus* POU factors of subclass V inhibit activin/nodal signaling during gastrulation // *Mech Dev.* 2006. V.123(8). P. 614-625.
 16. Cao Y. Germ layer formation during *Xenopus* embryogenesis: the balance between pluripotency and differentiation. // *Sci. China Life Sci.* 2015. V. 58. P. 336–342.
 17. Chen C.S. Mechanotransduction - a field pulling together? // *Journal of cell science.* 2008. V. 121. P. 3285–3292.
 18. Cramer L.P., Siebert M., Mitchison T.J. Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force // *The Journal of cell biology.* 1997. V. 136(6). P. 1287–1305.
 19. Deanfield J.E., Halcox J.P., Rabelink T.J. Endothelial function and dysfunction:

- testing and clinical relevance // *Circulation*. 2007. V. 115(10). P. 1285–1295.
20. Delmas P. Polycystins: from mechanosensation to gene regulation // *Cell* 2004. V. 118. P. 145-148.
21. Dixon J.E., Allegrucci C., Redwood C., Kump K., Bian Y., Chatfield J., Chen Y.H., Sottile V., Voss S.R., Alberio R., Johnson A.D. Axolotl Nanog activity in mouse embryonic stem cells demonstrates that ground state pluripotency is conserved from urodele amphibians to mammals // *Development*. 2010. V. 137. P. 2973–2980.
22. Dolfini D., Mantovani R. Targeting the Y/CCAAT box in cancer: Ybx1 (Ybx1) or NF-Y? // *Cell Death Differ*. 2013. V. 20(5). P. 676-685.
23. Dolle P. Developmental expression of retinoic acid receptors (RARs) // *Nuclear Receptor Signaling*. 2009. V. 7. P. e006.
24. Dong X., Biswas A., Süel K. E., Jackson L. K., Martinez R., Gu H., Chook Y. M. Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1 // *Nature*. 2009. V. 458(7242). P. 1136–1141.
25. Downs K.M. Systematic localization of Oct-3/4 to the gastrulating mouse conceptus suggests manifold roles in mammalian development // *Dev Dyn*. 2008. V. 237. P. 464-475.
26. Drees B.E., Andrews K.M, Beckerle M.C. Molecular dissection of zyxin function reveals its involvement in cell motility // *J Cell Biol*. 1999. V. 147(7). P. 1549-1560.
27. Ehlermann J., Pfisterer P., Schorle H. Dynamic expression of Kruppel-like factor 4 (Klf4), a target of transcription factor AP-2alpha during murine mid-embryogenesis // *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003. V. 273. P. 677–680.
28. Eliseeva I.A., Kim E.R., Guryanov S.G., Ovchinnikov L.P., Lyabin D.N. Y-box-binding protein 1 (Ybx1) and its functions // *Biochemistry (Mosc)*. 2011. V. 76(13). P.1402-1433.
29. Ermakova G.V., Solovieva E.A., Martynova N.Y., Zraisky A.G. The homeodomain factor Xanf represses expression of genes in the presumptive

- rostral forebrain that specify more caudal brain regions // *Dev Biol.* 2007. V. 307(2). P. 483-497.
30. Eroshkin, F. M., Zaraisky, A. G. Mechano-sensitive regulation of gene expression during the embryonic development // *Genesis.* 2017. V. 55(4).
31. Esch D., Vahokoski J., Groves M.R., Pogenberg V., Cojocaru V., Vom Bruch H. A unique Oct4 interface is crucial for reprogramming to pluripotency // *Nature Cell Biology.* 2013. V. 15. P. 295–301.
32. Evdokimova V., Ovchinnikov L.P., Sorensen P.H. Y-box binding protein 1: providing a new angle on translational regulation // *Cell Cycle.* 2006. V. 5. P. 1143–1147.
33. Evdokimova V., Ruzanov P., Imataka H., Raught B., Svitkin Y., Ovchinnikov L.P., Sonenberg N. The major mRNA-associated protein Ybx1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer // *EMBO J.* 2001. V. 20(19). P. 5491–5502.
34. Evdokimova V., Tognon C., Ng T., Ruzanov P., Melnyk N., Fink D., Sorokin A., Ovchinnikov L.P., Davicioni E., Triche T.J., Sorensen P.H. Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by Ybx1 promotes an epithelial-mesenchymal transition // *Cancer Cell.* 2009. V. 15(5). P. 402-415.
35. Evdokimova V.M., Ovchinnikov L.P. Translational regulation by Y-box transcription factor: involvement of the major mRNA-associated protein, p50 // *Int.J. Biochem. Cell Biol.* 1999. V. 31. P. 139–149.
36. Exner, C.R.T., Kim, A.Y., Mardjuki, S.M., and Harland, R.M. Sall1 and sall4 repress pou5f3 family expression to allow neural patterning, differentiation, and morphogenesis in *Xenopus laevis*. // *Dev. Biol.* 2017. V. 425. P. 33–43.
37. Finkbeiner M.R., Astanehe A., To K., Fotovati A., Davies A.H., Zhao Y., Jiang H., Stratford A.L., Shadeo A., Boccaccio C. Profiling Ybx1 target genes uncovers a new mechanism for MET receptor regulation in normal and malignant human mammary cells // *Oncogene.* 2009. V. 28. P. 1421–1431.
38. Fournier M.F., Sauser R., Ambrosi D., Meister J.J., Verkhovsky A.B. Force transmission in migrating cells // *The Journal of cell biology.* 2010. V. 188(2).

- P. 287–297.
39. Fradelizi J., Noireaux V., Plastino J., Menichi B., Louvard D., Sykes C., Golsteyn R. M., Friederich E. ActA and human zyxin harbour Arp2/3-independent actin-polymerization activity // *Nat. Cell Biol.* 2001. V. 3. P. 699–707.
40. Frankenberg S.R., Frank D., Harland R., Johnson A.D., Nichols J., Niwa H., Schöler H.R., Tanaka E., Wylie C., Brickman J.M. The POU-er of gene nomenclature // *Development.* 2014. V. 141. P. 2921-2923.
41. Frum T., Halbisen M.A., Wang C., Amiri H., Robson P., Ralston A. Oct4 cell autonomously promotes primitive endoderm development in the mouse blastocyst // *Developmental cell.* 2013. V. 25. P. 610-622.
42. Giraldez A.J., Mishima Y., Rihel J., Grocock R.J., Van Dongen S., Inoue K., Enright A.J., Schier A.F. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs // *Science.* 2006. V. 312. P. 75–79.
43. Gold D.A., Gates R.D., Jacobs D.K. The early expansion and evolutionary dynamics of POU class genes // *Mol Biol Evol.* 2014. V. 31(12). P. 3136–3147.
44. Guo C., Xue Y., Yang G., Yin S., Shi W., Cheng Y., Yan X., Fan S., Zhang H., Zeng F. Nanog RNA-binding proteins Ybx1 and ILF3 affect pluripotency of embryonic stem cells // *Cell Biol Int.* 2016. V. 40(8). P. 847-860.
45. Guo T., Kong J., Liu Y., Li Z., Xia J., Zhang Y., Zhao S., Li F., Li J., Gu C. Transcriptional activation of NANOG by Ybx1 promotes lung cancer stem-like properties and metastasis // *Biochem Biophys Res Commun.* 2017. V. 487(1). P. 153-159.
46. Han X., Li P., Yang Z., Huang X., Wei G., Sun Y., Kang X., Hu X., Deng Q., Chen L., He A., Huo Y., Li D., Betzig E., Luo J. Zyxin regulates endothelial von Willebrand factor secretion by reorganizing actin filaments around exocytic granules // *Nat Commun.* 2017. – P.1-11.
47. Harland, R. M. In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos // *Methods Cell Biol.* 1991. V. 36. P. 685-695.
48. Hay D.C., Sutherland L., Clark J., Burdon T. Oct-4 knockdown induces similar

- patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2004. V. 22. P. 225–235
49. Hayakawa H., Uchiumi T., Fukuda T., Ashizuka M., Kohno K., Kuwano M., Sekiguchi M. Binding capacity of human Ybx1 protein for RNA containing 8-oxoguanine // *Biochemistry*. 2002. V. 41(42). P. 12739-44.
50. Hervy M., Hoffman L., Beckerle M.C. From the membrane to the nucleus and back again: bifunctional focal adhesion proteins // *Curr Opin Cell Biol*. 2006. V. 18(5). P. 524-532.
51. Hinkley C.S., Martin J.F., Leibham D., Perry M. Sequential expression of multiple POU proteins during amphibian early development // *Mol Cell Biol*. 1992. V. 12(2). P.638-649.
52. Hirata H., Tatsumi H., Sokabe M. Mechanical forces facilitate actin polymerization at focal adhesions in a zyxin-dependent manner // *J Cell Sci*. 2008. V. 121. P. 2795-2804.
53. Hoffman L.M., Jensen C.C., Chaturvedi A., Yoshigi M., Beckerle M.C. Stretch-induced actin remodeling requires targeting of zyxin to stress fibers and recruitment of actin regulators // *Molecular biology of the cell*. 2012. V.23(10). P. 1846–1859.
54. Hoffman L.M., Nix D.A., Benson B., Boot-Hanford R., Gustafsson E., Jamora C., Menzies A.S., Goh K.L., Jensen C.C., Gertler F.B., Fuchs E., Fässler R., Beckerle M.C. Targeted disruption of the murine zyxin gene // *Mol Cell Biol*. 2003. V. 23(1). P. 70-79.
55. Huang C. Hypertension, mechanical force, and renal disease // *Clin Exp Hypertens*. 2014. V. 2. P. 1009.
56. Ivanov A.I. Actin motors that drive formation and disassembly of epithelial apical junctions // *Front Biosci*. 2008. V. 13. P. 6662–6681.
57. Ivanova A.S., Tereshina M.B., Ermakova G.V., Belousov V.V., Zaraisky A.G. Agr genes, missing in amniotes, are involved in the body appendages regeneration in frog tadpoles // *Sci Rep*. 2013. V.3. P. 1279.
58. Jacobson A., Peltz S.W. Interrelationships of the pathways of mRNA decay and

- translation in eucaryotic cells // *Annu. Rev. Biochem.* 1996. V. 65. P. 693–739.
59. Julier A., Goll C., Korte B., Knochel W., and Wacker S.A. Pou-V factor Oct25 regulates early morphogenesis in *Xenopus laevis*. // *Dev. Growth Differ.* 2012. V. 54. P. 702–716.
60. Jurchott K., Bergmann S., Stein U., Walther W., Janz M., Manni I., Piaggio G., Fietze E., Dietel M., Royer H.D. Ybx1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 27988–27996.
61. Kadrmas J.L., Beckerle M.C. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004. V. 5. P. 920-931.
62. Kohno K., Izumi H., Uchiumi T., Ashizuka M., Kuwano M. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, Ybx1 // *Bioessays.* 2003. V. 25(7). P. 691-698.
63. Kosnopfel C., Sinnberg T., Schitteck B. Y-box binding protein 1--a prognostic marker and target in tumour therapy // *Eur J Cell Biol.* 2014. V. 93(1-2). P. 61-70.
64. Kotkamp K., Mössner R., Allen A., Onichtchouk D., Driever W. A Pou5f1/Oct4 dependent Klf2a, Klf2b, and Klf17 regulatory sub-network contributes to EVL and ectoderm development during zebrafish embryogenesis // *Developmental biology.* 2014. V. 385(2). P. 433–47.
65. Kouwaki T., Okamoto M., Tsukamoto H., Fukushima Y., Matsumoto M., Seya T., Oshiumi H. Zyxin stabilizes RIG-I and MAVS interactions and promotes type I interferon response // *Scientific Reports.* 2017. V. 7(1). P. 11905
66. Kretev D.A., Mordovkina D.A., Eliseeva I.A., Lyabin D.N., Polyakov D.N., Joshi V., Desforges B., Hamon L., Lavrik O.I., Pastre D. Inhibition of Transcription Induces Phosphorylation of Ybx1 at Ser102 and Its Accumulation in the Nucleus // *Cells.* 2019. V. 9. P. 104.
67. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. V. 227(5259). P. 680-685.
68. Laval F., Acloque H., Bertocchini F., Macleod D.J., Boast S., Bachelard E.,

- Montillet G., Thenot S., Sang H.M., Stern C.D., Samarut J., Pain B. The Oct4 homologue PouV and Nanog regulate pluripotency in chicken embryonic stem cells // *Development*. 2007. V. 134. P. 3549–3563.
- 69.Li B., Trueb B. Analysis of the alpha-actinin/zyxin interaction // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 33328-33335.
- 70.Li B., Zhuang L., Trueb B. Zyxin interacts with the SH3 domains of the cytoskeletal proteins LIMnebulette and Lasp-1 // *J Biol Chem*. 2004 V. 279. P. 20401-20410.
- 71.Li J., Pan G., Cui K., Liu Y., Xu S., Pei D. A dominant-negative form of mouse SOX2 induces trophectoderm differentiation and progressive polyploidy in mouse embryonic stem cells // *J Biol Chem*. 2007. V. 282. P. 19481–19492.
- 72.Livigni A., Peradziryi H., Sharov A.A., Chia G., Hammachi F., Migueles R.P., Sukparangsi W., Pernagallo S., Bradley M., Nichols J., Ko M.S.H., Brickman J.M. A conserved Oct4/POUV-dependent network links adhesion and migration to progenitor maintenance // *Curr Biol*. 2013. V. 23(22). P. 2233-2244.
- 73.Lu Z.H., Books J.T., Ley T.J. Ybx1 is important for late-stage embryonic development, optimal cellular stress responses, and the prevention of premature senescence // *Mol Cell Biol*. 2005. V. 25(11). P. 4625-4637.
- 74.Lund E., Liu M., Hartley R.S., Sheets M.D., Dahlberg J.E. Deadenylation of maternal mRNAs mediated by miR-427 in *Xenopus laevis* embryos // *RNA*. 2009. V. 15(12). P. 2351-2363.
- 75.Lyabin D.N., Eliseeva I.A., Ovchinnikov L.P. Ybx1 protein: functions and regulation // *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2014. V. 5(1). P. 95-110.
- 76.Ma B., Cheng H., Gao R., Mu C., Chen L., Wu S., Chen Q., Zhu Y. Zyxin-Siah2-Lats2 axis mediates cooperation between Hippo and TGF- β signalling pathways // *NATURE COMMUNICATIONS*. 2016. V. 7. P. 1-13.
- 77.Martynova N.Y., Ermolina L.V., Ermakova G.V., Eroshkin F.M., Gyoeva F.K., Baturina N.S., Zaraisky A.G. The cytoskeletal protein Zyxin inhibits Shh signaling during the CNS patterning in *Xenopus laevis* through interaction with the transcription factor Gli1 // *Dev Biol*. 2013. V. 380(1). P. 37-48.

78. Martynova N.Y., Eroshkin F.M., Ermolina L.V., Ermakova G.V., Korotaeva A.L., Smurova K.M., Gyoeva F.K., Zاراisky A.G. The LIM-domain protein Zyxin binds the homeodomain factor Xanf1/Hesx1 and modulates its activity in the anterior neural plate of *Xenopus laevis* embryo // *Dev Dyn*. 2008. V. 237(3). P. 736-749.
79. 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. V. 2 (2). P. 100449.
80. Martynova N.Y., Parshina E.A., Zاراisky A.G. Using RNA-binding proteins for immunoprecipitation of mRNAs from *Xenopus laevis* embryos // *STAR Protocols*. 2021. V. 2 (2). P. 100552.
81. Matheson LA , Maksym GN , Santerre JP, Labow RS . Cyclic biaxial strain affects U937 macrophage-like morphology and enzymatic activities // *J Biomed Mater Res A*. 2006. V. 76. P. 52-62.
82. Matsumoto K., Tanaka K.J., Tsujimoto M. An acidic protein, YBAP1, mediates the release of Ybx1 from mRNA and relieves the translational repression activity of Ybx1 // *Mol Cell Biol*. 2005. V 25(5). P. 1779-1792.
83. Mege R.M., Gavard J., Lambert M. Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton // *Curr Opin Cell Biol*. 2006. V. 18. P. 541–548.
84. Minich W.B., Ovchinnikov L.P. Role of cytoplasmic mRNP proteins in translation // *Biochimie*. 1992. V. 74(5). P. 477-483.
85. Mo D., Fang H., Niu K., Liu J., Wu M., Li S., Zhu T., Aleskandarany M.A., Arora A., Lobo D.N. Human Helicase RECQL4 Drives Cisplatin Resistance in Gastric Cancer by Activating an AKT-YB1-MDR1 Signaling Pathway // *Cancer Res*. 2016. V. 76. P. 3057–3066.
86. Mordovkina D., Lyabin D.N., Smolin E.A., Sogorina E.M., Ovchinnikov L.P., Eliseeva I. Y-Box Binding Proteins in mRNP Assembly, Translation, and Stability Control // *Biomolecules*. 2020. V.10(4). P. 591.
87. Morichika K., Sugimoto M., Yasuda K., Kinoshita T. Possible regulation of Oct60 transcription by a positive feedback loop in *Xenopus* oocytes // *Zygote*.

2014. V. 22(2) P. 266-274.
88. Morrison G.M., Brickman J.M. Conserved roles for Oct4 homologues in maintaining multipotency during early vertebrate development // *Development*. 2006. V. 133. P. 2011-2022.
89. Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I., Scholer H., Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4 // *Cell*. 1998. V. 95. P. 379–391.
90. Nieuwkoop P. D., Faber, J. Normal Table of *Xenopus Laevis* (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis. Amsterdam : North-Holland Pub. Co. 1967. 282 p.
91. Niwa H., Sekita Y., Tsend-Ayush E., Grutzner F. Platypus Pou5f1 reveals the first steps in the evolution of trophectoderm differentiation and pluripotency in mammals // *Evolution & Development*. 2008. V. 10. P. 671–682.
92. Nix D.A, Beckerle M.C. Nuclear-cytoplasmic shuttling of the focal contact protein, zyxin: a potential mechanism for communication between sites of cell adhesion and the nucleus // *J Cell Biol*. 1997. V. 138. P. 1139-1147.
93. Nix DA, Fradelizi J, Bockholt S, Menichi B, Louvard D, Friederich E, Beckerle MC. Targeting of zyxin to sites of actin membrane interaction and to the nucleus // *J Biol Chem*. 2001. V. 276(37). P. 34759-34767.
94. Okamoto T., Izumi H., Imamura T., Takano H, Ise T., Uchiumi T., Kuwano M., Kohno K. Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, Ybx1: a mechanism for regulation of human gene expression // *Oncogene*. 2000. V. 19. P. 6194–6202.
95. Oldenburg J., van der Krogt G., Twiss F., Bongaarts A., Habani Y., Slotman J.A., Houtsmuller A., Huveneers S., de Rooij J. VASP, zyxin and TES are tension-dependent members of Focal Adherens Junctions independent of the α -catenin-vinculin module // *Sci Rep*. 2015. V. 5.
96. Onichtchouk D. Evolution and functions of Oct4 homologs in non-mammalian

- vertebrates // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016. V. 1859. P. 770–779.
97. Onichtchouk, D., Geier, F., Polok, B., Messerschmidt, D. M., Mossner, R., Wendik, B. Zebrafish Pou5f1-dependent transcriptional networks in temporal control of early development // *Molecular Systems Biology*. 2010. V. 6. P. 1-18.
98. Paranjpe S.S., Veenstra G.J. Establishing pluripotency in early development // *Biochim Biophys Acta*. 2015. V. 1849(6). P. 626-636.
99. 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., Zaraisky A.G., Martynova N.Y. Cytoskeletal Protein Zyxin Inhibits the Activity of Genes Responsible for Embryonic Stem Cell Status // *Cell Rep*. 2020. V. 33(7). P. 108396.
100. Radziskeuskaya A., Chia Gle B., dos Santos R.L., Theunissen T.W., Castro L.F., Nichols J., Silva J.C. A defined Oct4 level governs cell state transitions of pluripotency entry and differentiation into all embryonic lineages // *Nature cell biology*. 2013. V. 15. P. 579- 590.
101. Reinhard M., Zumbunn J., Jaquemar D., Kuhn M., Walter U., Trueb B. An alpha-actinin binding site of zyxin is essential for subcellular zyxin localization and alpha-actinin recruitment // *J Biol Chem*. 1999. V. 274. P. 13410-13418.
102. Rosner M.H., Vigano M.A., Ozato K., Timmons P.M., Poirier F., Rigby P.W., Staudt L.M. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo // *Nature*. 1990. V. 345. P. 686-692.
103. Ruzanov P.V., Evdokimova V.M., Korneeva N.L., Hershey J.W., Ovchinnikov L.P. Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments // *J Cell Sci*. 1999. V. 112. P. 3487-3496.
104. Ryan A.K., Rosenfeld M.G. POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes // *Genes Dev*. 1997. V. 11. P. 1207–1225.
105. Sabino F., Madzharova E., Auf dem Keller U. Cell density-dependent proteolysis by HtrA1 induces translocation of zyxin to the nucleus and increased

- cell survival // *Cell Death Dis.* 2020. V. 11(8). P. 674.
106. Scerbo P., Girardot F., Vivien C., Markov G.V., Luxardi G., Demeneix B., Kodjabachian L., Coen L. Ventx factors function as Nanog-like guardians of developmental potential in *Xenopus* // *PLoS ONE*. 2012. V. 7. P. e36855
107. Schier A.F. The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs // *Science*. 2007. V. 316(5823). P. 406-407.
108. Schiller H.B., Friedel C.C., Boulegue C., Fässler R. Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins // *EMBO reports*. 2011. V. 12(3). P. 259–266.
109. Schmeichel K. L., Beckerle M. C. The LIM domain is a modular protein-binding interface // *Cell*. 1994. V.79 (2). P. 211-219.
110. Schuff M, Siegel D, Philipp M, Bundschu K, Heymann N, Donow C, Knöchel W. Characterization of *Danio rerio* Nanog and functional comparison to *Xenopus* Vents. // *Stem Cells Dev.* 2012. V. 21. P. 1225–1238.
111. Session A.M., Uno Y., Kwon T., Chapman J.A., Toyoda A., Takahashi S., Fukui A., Hikosaka A., Suzuki A., Kondo M., van Heeringen S.J., Quigley I., Heinz S., Ogino H., Ochi H., Hellsten U., Lyons J.B., Simakov O., Putnam N., Stites J., Kuroki Y., Tanaka T., Michiue T., Watanabe M., Bogdanovic O., Lister R., Georgiou G., Paranjpe S.S. , van Kruijsbergen I., Shu S., Carlson J., Kinoshita T., Ohta Y., Mawaribuchi S., Jenkins J., Grimwood J., Schmutz J., Mitros T., Mozaffari S.V., Suzuki Y., Haramoto Y., Yamamoto T.S., Takagi C., Heald R., Miller K., Haudenschild C., Kitzman J., Nakayama T., Izutsu Y., Robert J., Fortriede J., Burns K., Lotay V., Karimi K., Yasuoka Y., Dichmann D.S., Flajnik M.F., Houston D.W., Shendure J., DuPasquier L., Vize P.D., Zorn A.M., Ito M., Marcotte E.M., Wallingford J.B. , Ito Y., Asashima M., Ueno N., Matsuda Y., Veenstra G.J., Fujiyama A., Harland R.M., Taira M., Rokhsar D.S. Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis* // *Nature*. 2016. V. 538(7625). P. 336-343.
112. Shiota M., Izumi H., Onitsuka T., Miyamoto N., Kashiwagi E., Kidani A., Yokomizo A., Naito S., Kohno K. Twist promotes tumor cell growth through

- Ybx1 expression // *Cancer Res.* 2008 V. 68. P. 98-105.
113. Skabkin M. A., Kiselyova O. I., Chernov K. G., Sorokin A. V., Dubrovin E. V., Yaminsky I. V., Vasiliev V. D., Ovchinnikov L. P. Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein Ybx1 // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. 5621-5635.
114. Smith M.A., Hoffman L.M., Beckerle M.C. LIM proteins in actin cytoskeleton mechanoresponse // *Trends Cell Biol.* 2014. V. 24(10). P. 575-583.
115. Sokol, S. Y. Mechanotransduction During Vertebrate Neurulation // *Current topics in developmental biology.* 2016. P.117. V. 359–76.
116. Sommerville, J., and Ladomery, M. Masking of mRNA by Y-box proteins. // *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 1996. V.10(4). P. 435–443.
117. Sorokin A.V., Selyutina A.A., Skabkin M.A., Guryanov S.G., Nazimov I.V., Richard C., Th'ng J., Yau J., Sorensen P.H., Ovchinnikov L.P. Proteasome-mediated cleavage of the Y-box-binding protein 1 is linked to DNA-damage stress response // *EMBO J.* 2005. V. 24. P. 3602–3612.
118. Sperry R.B., Bishop N.H., Bramwell J.J., Brodeur M.N., Carter M.J., Fowler B.T., Lewis Z.B., Maxfield S.D., Staley D.M., Vellinga R.M., Hansen M.D. Zyxin controls migration in epithelial-mesenchymal transition by mediating actin-membrane linkages at cell-cell junctions // *J Cell Physiol.* 2010. V. 222(3). P. 612-624.
119. Steele A.N., Sumida G.M., Yamada S. Tandem zyxin LIM sequences do not enhance force sensitive accumulation // *Biochem Biophys Res Commun.* 2012. V. 422. P. 653-657.
120. Stratford A.L., Fry C.J., Desilets C., Davies A.H., Cho Y.Y., Li Y., Dong Z., Berquin I.M., Roux P.P., Dunn S.E. Y-box binding protein-1 serine 102 is a downstream target of p90 ribosomal S6 kinase in basal-like breast cancer cells // *Breast Cancer Res.* 2008. V. 10. P. R99.
121. Suchyna T, Sachs F. Mechanical and electrical properties of membranes from dystrophic and normal mouse muscle // *J Physiol Lond.* 2007. V. 581(Pt

- 1). P. 369-387.
122. Sun Z., Huang S., Li Z., Meininger G. Zyxin is involved in regulation of mechanotransduction in arteriole smooth muscle cells // *Frontiers in Physiology*. 2012. V. 3. P. 1–10.
123. Sun, Y., Liu, J., Wang, B., Liu, X., Du, X., Liu, Y., and Zhang, Q. Klf4 could be activated by Pou5f3/Stat3 to induce the expression of Nanog in Japanese flounder // *Gene*. 2019. P. 687. V. 56–63.
124. Sutherland B.W., Kucab J., Wu J., Lee C., Cheang M.C., Yorida E., Turbin D., Dedhar S., Nelson C., Pollak M. Akt phosphorylates the Y-box binding protein 1 at Ser102 located in the cold shock domain and affects the anchorage-independent growth of breast cancer cells // *Oncogene*. 2005. V. 24. P. 4281–4292.
125. Tadros W., Goldman A.L., Babak T., Menzies F., Vardy L., Orr-Weaver T., Hughes T.R., Westwood J.T., Smibert C.A., Lipshitz H.D. SMAUG is a major regulator of maternal mRNA destabilization in *Drosophila* and its translation is activated by the PAN GU kinase // *Dev Cell*. 2007. V. 12 P. 143–155.
126. Tafuri S.R., Wolffe A.P. *Xenopus* Y-box transcription factors: molecular cloning, functional analysis and developmental regulation // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990. V. 87(22). P. 9028-9032.
127. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. V. 126. P. 663-676.
128. Takebayashi-Suzuki K., Arita N., Murasaki E., Suzuki A. The *Xenopus* POU class V transcription factor XOct-25 inhibits ectodermal competence to respond to bone morphogenetic protein-mediated embryonic induction // *Mechanisms of Development*. 2007. V. 124. P. 840–855.
129. Tapia N., Reinhardt P., Duemmler A., Wu G., Arauzo-Bravo M. J., Esch D. Reprogramming to pluripotency is an ancient trait of vertebrate Oct4 and Pou2 proteins // *Nature Communications*. 2012. V. 3. P. 1-11.

130. Tereshina M.B., Ermakova G.V., Ivanova A.S., Zarskiy A.G. Ras-dval small GTPase regulates telencephalon development in *Xenopus laevis* embryos by controlling Fgf8 and Agr signaling at the anterior border of the neural plate // *Biol Open*. 2014. V. 3(3). P. 192-203.
131. Thiery J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression // *Nat Rev Cancer*. 2002. V. 2. P. 442–454.
132. Uemura A., Nguyen T.N., Steele A.N., Yamada S. The LIM domain of Zyxin is sufficient for force-induced accumulation of Zyxin during cell migration // *Biophys J*. 2011. V. 101. P. 1069-1075.
133. Van der Gaag E.J., Leccica M.T., Dekker S.K., Jalbert N.L., Amodeo D.M., Byers H.R. Role of Zyxin in differential cell spreading and proliferation of melanoma cells and melanocytes // *J Invest Dermatol*. 2002. V. 118. P. 246-254.
134. Van der Velden, A. W., Destree, O. H., Voorma, H. O., and Thomas, A. A. Controlled translation initiation on insulin-like growth factor 2-leader 1 during *Xenopus laevis* embryogenesis // *The International journal of developmental biology*. 2000. V. 44(8). P. 843–850.
135. Venkatarama T., Lai F., Luo X., Zhou Y., Newman K., King M.L. Repression of zygotic gene expression in the *Xenopus* germline // *Development*. 2010. V. 137(4). P. 651-660.
136. Wang N. Review of cellular mechanotransduction // *J Phys D Appl Phys*. 2017. V. 50. P. 233002.
137. Wang Y., Gilmore T.D. Zyxin and paxillin proteins: focal adhesion plaque LIM domain proteins go nuclear // *Biochim Biophys Acta*. 2003. V. 1593. P. 115-120.
138. Westerfield, M. (2000) 'The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*)' - 4th edition, University of Oregon Press, Eugene.
139. Whitfield T., Heasman J., Wylie C. XLPOU-60, a *Xenopus* POU-domain mRNA, is oocyte-specific from very early stages of oogenesis, and localised to presumptive mesoderm and ectoderm in the blastula // *Dev Biol*. 1993. V.

- 155(2). P. 361-370.
140. Whitfield T.T., Heasman J., Wylie C.C. Early embryonic expression of XLPOU-60, a *Xenopus* POU-domain protein // *Dev Biol*. 1995. V. 169(2). P. 759-769.
141. Yamamura M., Noguchi K., Nakano Y., Segawa E., Zushi Y., Takaoka K, Kishimoto H., Hashimoto-Tamaoki T., Urade M. Functional analysis of Zyxin in cell migration and invasive potential of oral squamous cell carcinoma cells // *Int J Oncol*. 2013. V. 42(3). P. 873-880.
142. Yoshigi M., Hoffman L.M., Jensen C.C., Yost H.J., Beckerle M.C. Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement // *J Cell Biol*. 2005. V. 171. P. 209-215.
143. Young J.J., Kjolby R.A., Kong N.R., Monica S.D., Harland R.M. Spalt-like 4 promotes posterior neural fates via repression of pou5f3 family members in *Xenopus* // *Development*. 2014. V. 141. P. 1683-1693.
144. Zavadil J., Bottinger E.P. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions // *Oncogene*. 2005. V. 24. P. 5764–5774.