



УДК 577.218

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИЙ ЦИТОСКЕЛЕТНОГО БЕЛКА ЗИКСИНА НА ЕГО ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ НА МОДЕЛИ ЭМБРИОНОВ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ *Xenopus laevis*

© 2025 г. Е. А. Паршина*, Э. И. Иванова**, А. Г. Зарайский*, Н. Ю. Мартынова*,[#]

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

** Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России,
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 23.09.2024 г.

После доработки 05.10.2024 г.

Принята к публикации 06.10.2024 г.

Зиксин – консервативный механочувствительный LIM-доменний белок, регулирующий сборку F-актиновых филаментов в клеточных контактах. В то же время в ответ на растяжение клеток зиксин может перемещаться в ядро и регулировать экспрессию генов. Это перемещение может регулироваться его посттрансляционными модификациями. Поскольку зиксин признан онкомаркером, изучение модификаций этого белка и механизмов его перемещения между ядром и цитоплазмой открывает возможности для диагностических исследований на молекулярном уровне. С использованием модельного организма, эмбрионов шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) на стадии гастроулы, было показано влияние направленного мутагенеза по сайтам пальмитилирования, глюкозамилирования, а также по N- и C-концевым аминокислотным остаткам на способность зиксина перемещаться в ядро. Показано, что направленный мутагенез сайтов возможного пальмитилирования приводит к уменьшению количества зиксина в ядре, а мутирование аминокислот, подвергающихся глюкозамилированию, наоборот, приводит к увеличению количества зиксина в ядре. Также было показано, что добавление Flag-эпипотопа на C-конец молекулы зиксина приводит к утрате его способность к перемещению в ядро. Полученные данные впервые, насколько нам известно, свидетельствуют о влиянии указанных модификаций на перемещение зиксина и дополняют мировые исследования о механизмах изменения локализации механочувствительных белков семейства зиксина. Помимо фундаментального значения, эти данные могут иметь перспективную ценность и для биомедицинских исследований, в особенности учитывая тот факт, что нарушение внутриклеточной локализации зиксин-подобных белков приводит к образованию раковых опухолей и заболеваний сердечно-сосудистой системы.

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

DOI: 10.31857/S0132342325020118, **EDN:** LBPRFF

ВВЕДЕНИЕ

Передача клеточного сигнала – фундаментальный процесс, регулирующий все биологические функции клеток. В этом сложном процессе белок зиксин играет ключевую роль, участвуя во взаимодействиях с различными белками и моду-

лируя основные клеточные активности, такие как адгезия, миграция, дифференцировка и рост клеток [1–9]. Однако точные механизмы, лежащие в основе участия зиксина в сигнальных путях, остаются не полностью выясненными. Изучение роли зиксина в регуляции передачи сигналов и его вклада в прогрессирование ряда заболевания

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

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (916) 181-16-32; эл. почта: marnat61@gmail.com).

не только помогает выявлять патологические процессы, но и может помочь в разработке новых терапевтических мишеней.

Зиксин представляет собой LIM-доменный белок, расположенный преимущественно в фокальных спайках (FA), адгезионных соединениях и актиновых стрессовых волокнах. У шпорцевой лягушки молекула зиксина состоит из из 664 а.о. и содержит три функционально различающиеся области: *N*-концевой пролин-богатый домен (Р-домен), *C*-концевой участок, содержащий три tandemно расположенных LIM-домена, и в середине молекулы находится сигнал ядерного экспорта (NES), богатый остатками лейцина [10–16]. *N*-концевой пролин-богатый домен содержит ряд повторов, состоящих из остатков пролина, и эта уникальная структура позволяет зиксину участвовать в сложных белок-белковых взаимодействиях, влияющих на динамические изменения клеточного цитоскелета [17]. *C*-концевая часть состоит из трех LIM-доменов (названы от начальных букв факторов Lin-11, Isl-1 и Mec-3). Каждый LIM-домен представляет собой уникальную структуру с двойными цинковыми пальцами, служащую платформой для взаимодействий белок-белок или белок-нуклеиновая кислота. Эти мотивы играют решающую роль в восприятии механических сил [18, 19]. Последовательность ядерного экспорта, NES, расположена в центральном регионе молекулы зиксина. Это последовательность, богатая остатками лейцина, которая может связываться с ядерными транспортными белками. Предполагается, что NES участвует в передаче сигналов между фокальными спайками и ядром клетки [17, 20, 21].

Зиксин – mechanosensorный белок. При возникновении механической стимуляции он, во-первых, может проникать в ядро клетки и впоследствии выходить из ядра благодаря NES-последовательности. Во-вторых, зиксин способен перемещаться из комплексов фокальной адгезии вдоль стресс-фибрилл, где участвует в полимеризации актина. Механизм перемещения зиксина в ядро до сих пор детально не изучен. В молекуле зиксина нет канонического сигнала ядерной локализации NLS (Nuclear Localization Signal), поэтому его перемещение в ядро с большой вероятностью происходит за счет взаимо-

действия с белками-партнерами. Показано, что активность зиксина модулируется его внутримолекулярным взаимодействием по типу голова–хвост, т.е. его *C*-концевая LIM-доменная область взаимодействует с *N*-концевой пролин-богатой областью, делая “закрытую” молекулу недоступной для взаимодействия с белками. Наиболее изученная модификация зиксина человека – фосфорилирование по Ser142, в результате которого происходит разрушение этого внутреннего взаимодействия, и зиксин становится открыт для связывания с партнерами [23]. Кроме фосфорилирования показано, что на перемещение зиксина из цитоплазмы в ядро могут оказывать влияние гликозилирование, ацетилирование, пальмитилирование и появление его укороченной формы, содержащей только LIM-домены [22, 24–27]. Так, ядерный белок семейства фосфoserин/тронин-связывающих белков 14-3-3 γ может взаимодействовать с зиксином, при этом гликозилирование зиксина по Ser169 усиливает это взаимодействие. В результате было показано, что избыточная экспрессия 14-3-3 γ увеличивала количество зиксина в ядре [25]. При помощи скрининга *in silico* было обнаружено и продемонстрировано экспериментально, что зиксин может быть пальмитилирован. Известно, что эта модификация также может влиять на внутриклеточное перемещение белков [26]. Недавно было показано, что в экссудатах ран мlekопитающих возможен протеолиз зиксина по сайту серинпептидазы 1 HtrA, расположенному в его *N*-концевой области. Усеченная форма зиксина, состоящая из LIM-доменной области, транслируется в ядро, где модулирует активность генов, участвующих в заживлении ран [28]. В своей работе [27] мы показали, что такая укороченная форма действительно присутствует в ядре на ранних стадиях развития эмбрионов шпорцевой лягушки.

Основной целью представленной работы было изучение влияния посттрансляционных модификаций – пальмитилирования, глюкозаминилирования, а также мутирования по *N*- и *C*-концевым аминокислотным остаткам – на способность зиксина перемещаться от цитоплазматической мембранны и мест фокальной адгезии в ядро в системе *in vivo* на модели эмбрионов *Xenopus laevis*. Учитывая тот факт, что ядерная транслокация зиксина зависит от механического стресса и может

приводить к изменению генной экспрессии, данные о влиянии модификаций зиксина на его транслокацию в ядро могут помочь в понимании регуляции процессов дифференцировки в зависимости от механических стимулов, которые испытывает клетка, что особенно актуально для онтогенеза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы исследовали влияние нескольких модификаций зиксина на его распределение между цитоплазмой и ядром в системе *in vivo* на модели эмбрионов шпорцевой лягушки (*X. laevis*) на стадии гаструлы. Использование модельного организма стало возможным, поскольку многие известные для зиксина человека сайты модификаций оказались консервативными и присутствуют в молекуле зиксина *X. laevis*. В работе были использованы генно-инженерные методы для создания мутантных по сайтам модификации и процессинга форм зиксина.

Сравнение аминокислотных последовательностей гомологов зиксина лягушки (xenZyx), курицы (galZYX) и человека (hom ZYX), приведенное на рис. 1 a , показало высокий консерватизм в пролин-богатой и Lim-доменной областях (области, выделенные черным). В центральной части молекулы гомологии меньше, но при сопоставлении небольших участков, подвергающихся ацетилированию и протеолизу, у всех гомологов зиксина удалось обнаружить консервативные последовательности, что и позволило использовать эти сайты для дальнейшего мутагенеза. Выбранные для мутагенеза участки и аминокислоты изображены на рис. 1 b .

Для направленного мутагенеза по выбранным аминокислотам были созданы плазмиды, позволяющие получать синтетические РНК, кодирующие мутантные версии зиксина, при помощи транскрипции *in vitro*. Синтетические РНК использовали для микроинъекций в эмбрионы для экспрессии мутантных версий зиксина непосредственно в клетках эмбрионов. В работе были созданы и использованы конструкции, схемы которых приведены на рис. 1 b :

– Mys-Zyxin-flag – вектор для получения синтетической РНК с последовательностью полноразмерного зиксина с антигенными детерминантами

Mys и Flag-пептидами на *N*- и *C*-концевых последовательностях соответственно;

- Mys-Zyxin4xCmut-flag – методом направленного мутагенеза в последовательности полноразмерного *N*-Mys-Flag-меченного зиксина были изменены сайты возможного пальмитилирования зиксина (замена Cys531, 532, 555, 558 и 593 на аланин);
- Mys-zyxin – вектор для получения синтетической РНК с последовательностью полноразмерного зиксина с Mys-детерминантой на *N*-концевой последовательности;
- Mys-Zyxin4xCmut – в последовательности полноразмерного *N*-Mys-меченного зиксина были изменены сайты возможного пальмитилирования (замена Cys531, 532, 555, 558 и 593 на аланин). Было мутировано три сайта возможного пальмитилирования, расположенных в консервативной LIM-домене области (рис. 1);
- Zyxin 216-217aa mut – в последовательности полноразмерного зиксина точечно мутированы Ser216 и 217, подвергающиеся *O*-ацетилглюкозаминилированию заменены на аланины S/A 216–217 (рис. 1);
- Zyxin 334-664aa – использовали созданный ранее [28] вектор для получения синтетической РНК, кодирующую делекционный мутант зиксина, соответствующий *C*-концевой эндогенной изоформе 335–663 а.о.

Все конструкции созданы на основе вектора pCS-2, позволяющего получать матрицу для синтеза соответствующей мРНК с промотором SP6 после линеаризации плазмида при помощи рестриктазы NotI. Подробное описание всех клонирований с последовательностями использованных праймеров приведено в табл. 1. Для получения мутантных форм зиксина в клетках развивающихся эмбрионов использовали стандартную методику микроинъекций синтетических РНК, кодирующих мутантные версии зиксина, в эмбрионы на стадии начала дробления. Анализ эффектов от введения мутантов проводили на стадии гаструляции (11–13 стадии). Прежде всего оценивали фенотипические эффекты, которые проявляются именно на стадии гаструлы, когда происходит активное перемещение зародышевых тканей и закладываются основные осевые структуры зародыша. Следует отметить, что фенотипические эффекты от введения полноразмерных тегированных и

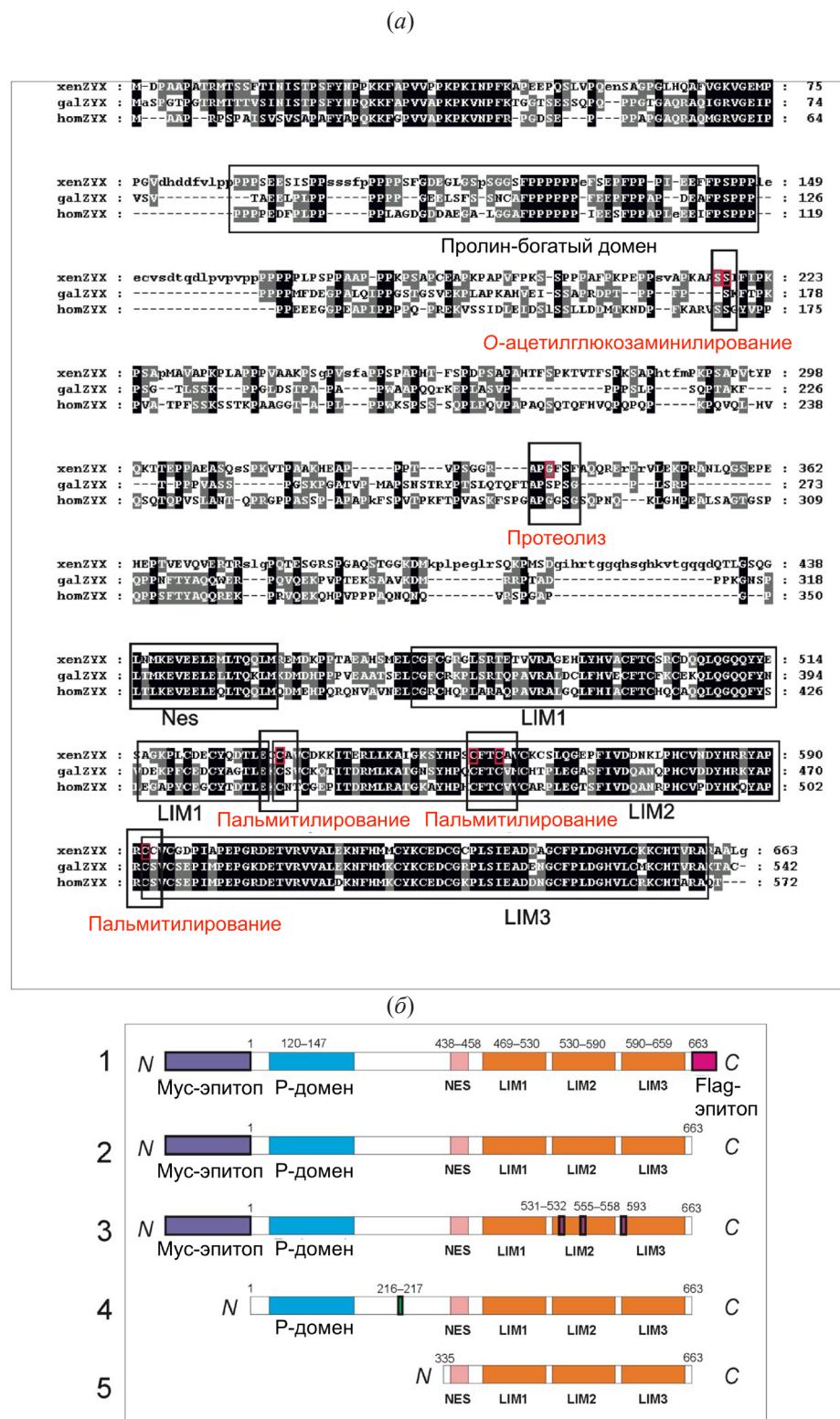


Рис. 1. Участки для направленного мутагенеза зиксина и схемы мутантных белков. (а) – Сравнение аминокислотных последовательностей гомологов зиксина из лягушки (*xenZYX*), курицы (*galZYX*) и человека (*homZYX*) показало высокий консерватизм в пролин-богатой и LIM-доменной областях (области, выделенные черным). На схеме приведены позиции, подвергавшиеся мутагенезу; (б) – схемы тагированных Mus (1–3) и Flag (1) эпиптапами и мутированных по сайтам пальмитилирования (3), глюкозаминилирования (4) и укороченной (5) версий зиксина.

Таблица 1. Получение векторов

Синтетическая мРНК	Праймеры и стратегии клонирования, использованные для создания ДНК-матриц для синтетических мРНК
myc-Zyxin-flag	<p>ПЦР с p35T-Zyxin full C-концевой части зиксина с праймерами: For AATTCTGCAAGCCAAACATGAAGC и Rev AATTCTTAGTCATCATCGTCTGTAGTCTCCAGGGCAGCGC.</p> <p>Рестрикция полученного фрагмента рестриктазами PstI и XbaI. Лигирование в плазмиду pCS2MT-Zyxin front по сайтом PstI и XbaI.</p> <p>Полученная конструкция – pCS2MT Zyxin flag.</p> <p>Для синтеза РНК – рестрикция NotI. Транскрипция с Sp6</p>
myc-Zyxin4xCmut-flag	<p>1. ПЦР с p35T-Zyxin full двух фрагментов C-концевой части зиксина с праймерами: For AATTCTGCAGCCAACATGAAGC; Rev GGAGCACTTACACACGGCAGCAAGTGAAAGGCCAGGGTGTAGGATT и For AAAIFCCTATCACCCCTGGCTTCACTGCCTGCCGTGAAGTGTCC, Rev AATTCTTAGTCATTTGTCATCATCGTCTGTAGTCTCCAGGGCAGCGC.</p> <p>1.2. Отклик полученных фрагментов друг на друга и амплификация.</p> <p>1.3. Рестрикция полученного фрагмента рестриктазами PstI и XbaI. Лигирование в плазмиду pCS2MT Zyxin front по сайтом PstI и XbaI.</p> <p>1.4. Полученная конструкция – pCS2MT Zyxin CFTC2 mut flag.</p> <p>2. Замена Cys531 и 532 на аланин.</p> <p>2.1. ПЦР с pCS2MT Zyxin CFTC2 mut flag двух фрагментов C-концевой части зиксина с праймерами: For AATTCTGCAGCCAACATGAAGC; Rev CTCTTGTGTCACAAAACAGGGGGCTCGAGTGTGTCCTGTA и For TACCAAGAACACACTCGAGGCCGCCGTGTTTGTGACAAGAAG; Rev AATTCTTAGTCATTTGTCATCATCGTCTTGTAGTCTCCAGGGCAGCGC.</p> <p>2.2. Аналогично 1.2.</p> <p>2.3. Аналогично 1.3.</p> <p>2.4. Полученная конструкция – pCS2MT Zyxin3xCmut flag.</p> <p>3. Замена Cys593 на аланин.</p> <p>3.1. ПЦР с pCS2MT Zyxin3xCmut flag двух фрагментов C-концевой части зиксина с праймерами: For AATTCTGCAGCCAACATGAAGC; Rev AATGGGGTCTCCACAAACAGGCACAGGGGGGGCGTATCG и For CGATAAGCCCCCCCCTGCTGTTGGAGACCCCAATT, Rev AATTCTTAGTCATTTGTCATCATCGTCTTGTAGTCTCCAGGGCAGCGC.</p> <p>3.2. Аналогично 1.2.</p> <p>3.3. Аналогично 1.3.</p> <p>3.4. Полученная конструкция – pCS2MT Zyxin4xCmut flag.</p> <p>Для синтеза РНК – рестрикция NotI. Транскрипция с Sp6</p>

Таблица 1. (Продолжение)

Синтетическая мРНК	Праймеры и стратегии клонирования, использованные для создания ДНК-матриц для синтетических мРНК
myc-Zyxin4xCmut	<p>ПЦР с pCS2MT Zyxin4xCmut flag C-концевой части Zyxin4xCmut с праймерами: For AATTCTGCAGCCAAACATGAAAGC и Rev AATTTCTAGATCATCCCAGGGCAGGCC.</p> <p>Рестрикция полученного фрагмента рестриктазами PstI и XbaI. Лигирование в плазмиду pCS2MT Zyxin front по сайтам PstI и XbaI.</p> <p>Полученная конструкция – pCS2MT Zyxin4xCmut.</p> <p>Для синтеза РНК – рестрикция NotI. Транскрипция с Sp6</p>
myc-zyxin	<p>ПЦР с p35T-Zyxin full C-концевой части зиксина с праймерами: For AATTCTGCAGCCAAACATGAAAGC и Rev AATTTCTAGATCATCCCAGGGCAGGCC.</p> <p>Рестрикция полученного фрагмента рестриктазами PstI и XbaI. Лигирование в плазмиду pCS2MT Zyxin front по сайтам PstI и XbaI.</p> <p>Полученная конструкция – pCS2MT Zyxin.</p> <p>Для синтеза РНК – рестрикция NotI. Транскрипция с Sp6</p>
Zyxin 216-217aa mut	<ol style="list-style-type: none"> ПЦР с p35T-Zyxin full двух фрагментов зиксина с праймерами: For AATTCTGCAGCCAAACATGGACCCAGGGCTCCT, Rev GGCTTAGGGATGAAAATGGGGCTGCAGGCCATTTCATCCCTAACCCC, и For GTGGCCCCAAGGGCTGCAGGCCATCCAGGGCAGGCC. Rev AATTTCTAGATCATCCCAGGGCAGGCC. Отжиг полученных фрагментов друг на друга и амплификация с праймерами: For AATTCTGCAGCCAAACATGGACCCAGGGCTCCT и Rev AATTTCTAGATCATCCCAGGGCAGGCC. Рестрикция полученного фрагмента рестриктазами Bpu1I и XbaI. Лигирование в плазмиду pCS2 Полученная конструкция – pCS2 Zyxin 216-217aa mut. <p>Для синтеза РНК – рестрикция NotI. Транскрипция с Sp6</p>
Zyxin 334-664aa	<p>ПЦР с p35T-Zyxin full C-концевой части зиксина с праймерами: For AATTGAATTGCCACCATGGCACCCGGGTCAAGCTT и Rev AATTTCTAGATCATCCCAGGGCAGGCC.</p> <p>Рестрикция полученного фрагмента рестриктазами EcoRI и XbaI. Лигирование в плазмиду pCS2</p> <p>по сайтам EcoRI и XbaI.</p> <p>Полученная конструкция – pCS2 Zyxin 334-664aa.</p> <p>Для синтеза РНК – рестрикция NotI. Транскрипция с Sp6</p>

мутантных форм зиксина были незначительными. Наблюдалось небольшое торможение развития и эффект экзогастролы. При сверхэкспрессии укороченного зиксина наблюдали разрыхление клеток в поверхностных слоях зародышей, что говорит об изменении в состоянии межклеточных контактов. Поскольку целевой задачей было изучение ядерной локализации зиксина, использовали методику разделения ядерной и цитоплазматической фракций из грубых гомогенатов зародышей на стадии гастролы, разработанную ранее [29, 30]. Из полученных фракций готовили образцы для электрофореза с последующим вестер-блоттингом и детекцией анти-С-зиксин-моноспецифичными поликлональными антителами кролика. После проявки изменения в интенсивности полос оценивали при помощи программы ImagG.

После применения созданных конструкций и анализа внутриклеточного распределения мутантных форм зиксина были получены следующие результаты.

1. Микроинъецирование синтетической РНК с последовательностью полноразмерного зиксина с антигенными детерминантами Mus и Flag-пептидами на *N*- и *C*-концевых последовательностях соответственно показало, что такой гибридный белок утрачивает способность к перемещению в ядро. При последовательном удалении пептидных меток выяснили, что критичной для перемещения полноразмерного белка в ядро выступает модификация Flag-пептидом на *C*-конце молекулы зиксина. Показано, что наличие Mus-эпиптопов на *N*-конце не влияет на его перемещение в ядро. Поэтому для дальнейших экспериментов использовали конструкцию с пептидной меткой Mus на *N*-конце (рис. 2а). Таким образом, впервые было показано, что на перемещение зиксина в ядро влияет добавление небольшого Flag-пептида на его *C*-конец. Это позволяет сделать предположение об участии *C*-концевого домена в ядерной транслокации зиксина.

2. Поиск возможных модификаций *C*-концевой области при помощи интернет-ресурсов показал, что наиболее вероятная модификация *C*-концевой области молекулы зиксина – это пальмитилирование. В работе [26] в результате анализа *in silico* зиксин был отобран как белок, подвергающийся пальмитилированию, и на его гибридной с GFP

версии с использованием радиоактивного субстрата было подтверждено это предположение. Пальмитилирование белков – посттрансляционная модификация, приводящая к увеличению гидрофобности белка, способствующая ассоциации с внутриклеточными и плазматической мембранными и регулирующая белковый траффик и функции. Оно происходит в результате присоединения насыщенной 16-углеродной пальмитиновой кислоты к определенным остаткам цистеина посредством образования лабильной тиоэфирной связи (тиопальмитоилирование или *S*-пальмитоилирование). В отличие от других липидных модификаций, например, пренилирования или меристирилирования, пальмитилирование – это обратимая модификация, которая может регулироваться внешними сигналами. Обратимая природа пальмитилирования позволяет белкам перемещаться между клеточными компартментами и участвовать в передаче клеточных сигналов [31–33].

С использованием программы поиска возможных сайтов пальмитилирования (<https://swisspalm.org/>) были найдены пять возможных сайтов, расположенные в консервативной LIM-доменной области, близко к его *C*-концу. Методом направленного мутагенеза у полноразмерного *N*-Мус-меченного зиксина были изменены эти сайты возможного пальмитилирования (замена Cys531, 532, 555, 558 и 593 на аланин). Такие мутации исключают возможность присоединения пальмитата. Схемы использованных конструкций приведены на рис. 1б, а схемы клонирования даны в табл. 1. В результате было показано, что замена этих цистеинов на аланины приводит к двукратному уменьшению количества полноразмерной формы зиксина в ядре. Ранее мы уже наблюдали, что добавление с *C*-конца молекулы зиксина Flag-пептида приводит к утрате его способности транслоцироваться в ядро, а данные по замене Cys531, 532, 555, 558, 593 на аланин еще раз демонстрируют участие LIM-доменной области в ядерной транслокации зиксина. Кроме этого, был получен мутант полноразмерного зиксина с антигенными детерминантами Mus и Flag-пептидами на *N*- и *C*-концевых последовательностях с мутациями по этим же остаткам Cys (531, 532, 555, 558, 593). Анализ распределения белка показал, но эти замены не изменяют его неспособность к перемещению в ядро при наличии

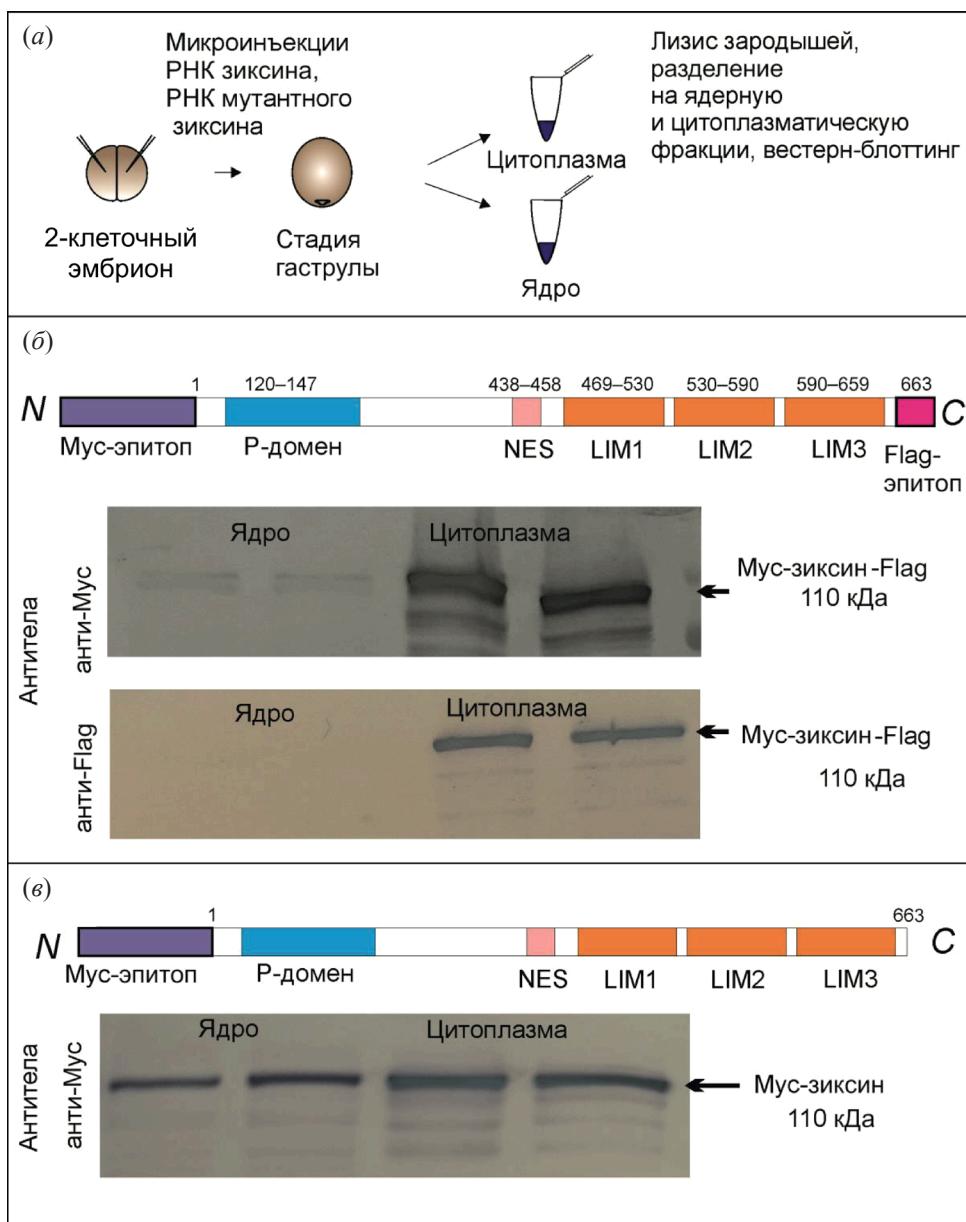


Рис. 2. Внутриклеточное распределение гибридных по *N*- и *C*-концевым доменам форм зиксина. (а) – Схема эксперимента; (б) – наличие Flag-пептида на *C*-конце препятствует его перемещению в ядро. Сверху – схема гибридного зиксина, ниже представлены вестерн-блоты с детекцией антителами анти-Мус (блот сверху) и анти-Flag (блот снизу), по две дорожки на каждую пробу; (в) – удаление Flag-пептида с *C*-конца молекулы зиксина восстанавливает его способность к перемещению в ядро. Сверху – схема гибридного белка, снизу – вестерн-блот с детекцией антителами анти-Мус, по две дорожки на пробу.

Flag-пептида на *C*-конце (данные не приведены). Кроме модификации пальмитатом, в недавней работе идентифицировали *O*-связанную GlcNAc-[*O*-GlcNAc]трансферазу, которая может гликозилировать зиксин и регулировать его ядерную локализацию [25]. Показано, что зиксин модифицируется по остатку Ser169, и это усиливает его

взаимодействие с белком 14-3-3 γ и увеличивает количество в ядре. Известно, что добавление *O*-GlcNAc к белкам участвует в функционировании белков посредством различных механизмов, которые включают регулирование фосфорилирования белков, изменение деградации белков, регулировку локализации белков, модуляцию

взаимодействий белок–белок и опосредование транскрипции. Кроме этого, добавление *N*-ацетилглюкозамина к остаткам серина и треонина широко распространено в белках цитоскелета или его регуляторных белках и тесно связано с метастазированием рака молочной железы, что указывает на то, что эта модификация может иметь значение в координации миграции клеток [34, 35].

3. Учитывая эти данные, мы исследовали с помощью направленного мутагенеза влияние модификации зиксина *N*-ацетилглюкозамином на его распределение между ядром и цитоплазмой. Как мы установили, последовательность зиксина человека содержит небольшой консервативный участок Ser169–Pro174, гомологичный последовательности из *X. laevis* Ser216–Pro222 (рис. 1 a). Для создания мутанта в последовательности полноразмерного нетагированного зиксина были точно мутированы Ser216 и 217, предположительно подвергающиеся модификации. Замена этих аминокислот на аланины (мутанты S217A и S216A) не вызывала заметных фенотипических эффектов, но приводила к повышению количества ядерного зиксина в 2 раза (рис. 2 σ). Это неожиданный результат, поскольку мутирование сайтов *N*-глюкозаминилирования должно было отрицательно повлиять на способность к перемещению зиксина в ядро. Вероятно, замена серинов с полярной OH-группировкой на аланины приводит к увеличению гидрофобности. Возможно, учитывая данные по пальмитилированию, даже небольшое увеличение гидрофобности белка помогает ассоциации с внутриклеточными мембранами и может способствовать ядерной транслокации зиксина.

4. Для анализа распределения между ядром и цитоплазмой укороченной формы зиксина мы использовали созданный нами ранее [27] делеционный мутант зиксина ΔZ_{Yxh1} (334–664 а.о.). Было показано, что экзогенный C-концевой фрагмент зиксина локализован как в ядре, так и в цитоплазме, а эндогенный C-концевой фрагмент зиксина – преимущественно в ядре (рис. 2 σ).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Векторы. Получение векторов представлено в табл. 1.

Синтетическая мРНК и микроинъекции мРНК в зародыши *X. laevis*. Получение зароды-

шей *X. laevis* и искусственное оплодотворение, а также синтез мРНК и микроинъекции проводили по методике, разработанной нами ранее [21]. Дробящиеся зародыши после микроинъекций инкубировали в растворе 0.1 MMR (модифицированный раствор Рингера для культивирования зародышей амфибий (0.1 MMR): 0.1 M NaCl, 2.0 mM KCl, 1 mM MgCl₂ × 6H₂O, 2 mM CaCl₂ × 2H₂O, 5 mM HEPES, pH 7.4) до стадии гастролы (12-я стадия) при 16–18°C.

Разделение лизата на ядерную и цитоплазматическую фракции и подготовка образцов для вестерн-блот-анализа. Зародыш на стадии гастролы использовали для разделения лизата на ядерную и цитоплазматическую фракции по ранее опубликованной методике [30] с небольшой модификацией, использованной в работе [27]. Ядра после очистки в 0.8 M сахарозе растворяли в буфере для коиммунопреципитации и центрифугировали 30 мин при 16 000 g и 4°C. Супернатант использовали для приготовления образцов для электрофореза.

Гель-электрофорез и иммуноблоттинг. Образцы анализировали с помощью SDS-PAGE в 7 или 10%-ных гелях по методу Лэммли и подвергали электроблоттингу на PVDF-мембране (Millipore Corp. Inc., Франция). В качестве первичных антител использовали анти-C-зиксин-моноспецифичные поликлональные антитела кролика, а в качестве контроля нагрузки – моноклональные антитела к актину либо α-тубулину (Sigma, США). Вторичными антителами были козий антикроличий Fab-фрагмент антитела, коньюгированный с щелочной фосфатазой (Sigma, США), и антимышиный Fab-фрагмент антитела, коньюгированный с щелочной фосфатазой (Sigma, США). Для детекции использовали стабилизированный субстрат для щелочной фосфатазы Western Blue (Promega, США). После проявки изменения в интенсивности полос оценивали при помощи программы ImageJ (<https://imagej.net/ij/>; разработка NIH, США)

Статистический анализ. Эксперименты по анализу изменений в экспрессии и локализации мутантных форм проводили в более чем трехкратном повторении, достоверность результатов оценивали по критерию Стьюдента, отличия считали статистически значимыми при $p < 0.05$ (рис. 3).

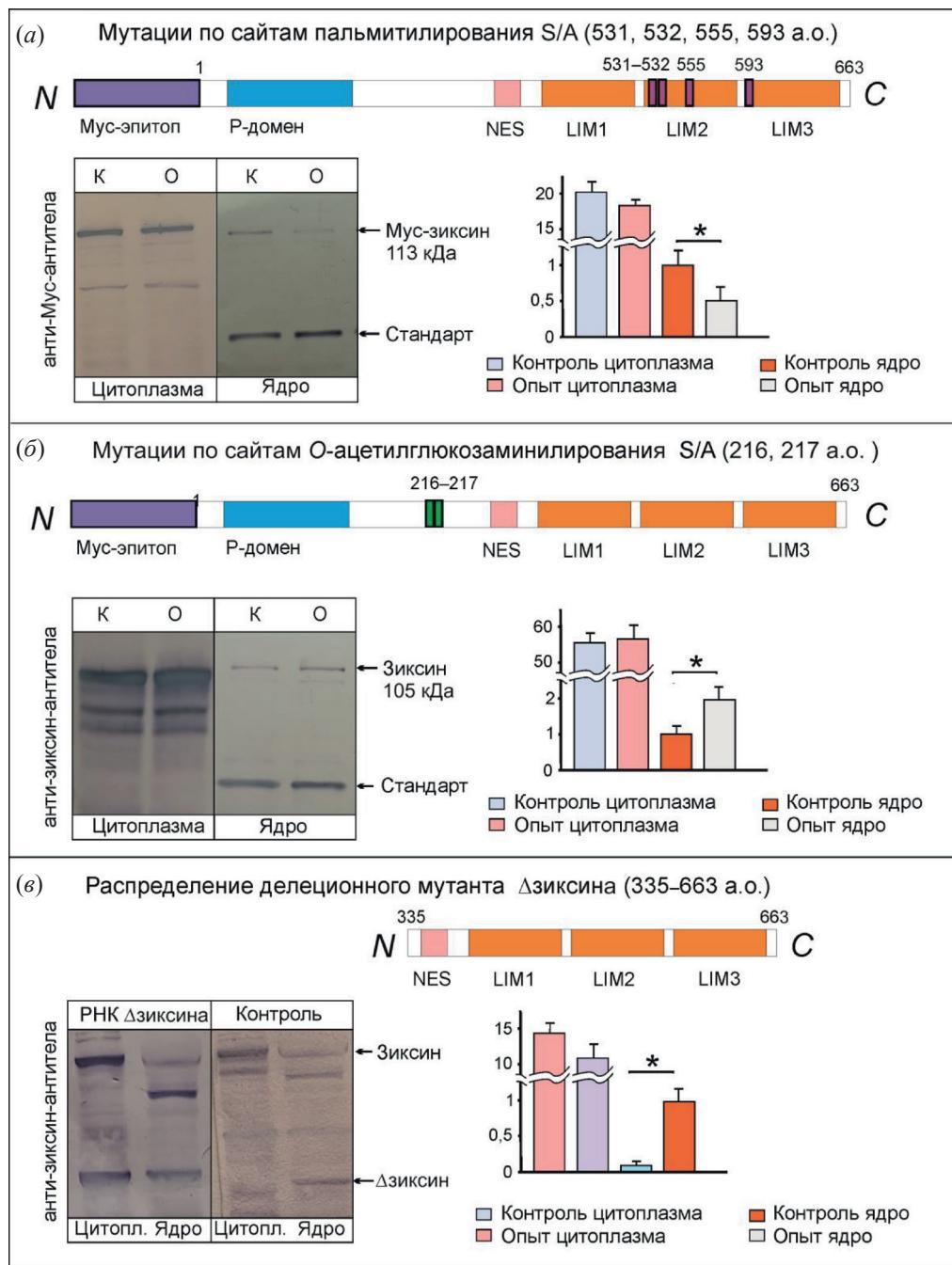


Рис. 3. Анализ распределения зиксина, мутантного по сайтам пальмитилирования, *O*-глюкозаминилирования и делеционного мутанта в клетках эмбрионов на стадии гастроулы. (а) – Мутации полноразмерного Мус-зиксина по сайтам пальмитилирования приводят к уменьшению зиксина в ядре. Сверху – схема мутантного зиксина, Cys531, 532, 555, 558 и 593 заменены на аланины. Слева – вестерн-блот с детекцией анти-Мус-антителами, референсная полоса нагрузки на дорожку – актин. Справа – проверка статистической достоверности изменения количества зиксина, усл. ед. (*p < 0.05); (б) – мутации полноразмерного зиксина по аминокислотам, подвергающимся *O*-глюкозаминилированию, приводят к уменьшению количества зиксина в ядре. Сверху – схема мутантного зиксина, Ser216 и 217 заменены на аланины. Слева – вестерн-блот, детекция антителами к *C*-зиксину, референсная полоса нагрузки на дорожку – актин. Справа – проверка статистической достоверности изменения количества зиксина, усл. ед. (*p < 0.05); (в) – анализ распределения между ядром и цитоплазмой укороченной формы зиксина (334–664 а.о.). Сверху – схема делеционного мутанта зиксина, Δзиксина (334–664 а.о.). Слева – вестерн-блот, детекция антителами к *C*-зиксину. Справа – проверка статистической достоверности изменения количества зиксина, усл. ед. (*p < 0.05).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено влияние посттрансляционных модификаций, таких как пальмитилирование, *O*-глюкозаминилирование и *N*-концевая делеционная мутация, механосенсорного белка зиксина на его распределение между ядром и цитоплазмой в ходе нормального развития на модели эмбрионов шпорцевой лягушки *X. laevis*. Показано, что, во-первых, замена Cys531, 532, 555, 558 и 593, расположенных в Lim-доменной области, на аланины приводит к двукратному уменьшению количества полноразмерной формы зиксина в ядре. Это подтверждает участие LIM-доменной области в ядерной транслокации зиксина за счет возможного присоединения пальмитата к указанным цистeinам. Во-вторых, мутирование сайта возможного *O*-глюкозаминилирования в результате замены Ser216 и 217 на аланины привело к увеличению количества зиксина в ядре. В-третьих, добавление Flag-пептида на *C*-конец молекулы зиксина приводит к утрате его способности перемещаться в ядро. И, кроме этого, показано равномерное распределение *C*-концевого делеционного мутанта зиксина (334–664 а.о.) между ядром и цитоплазмой.

Полученные результаты важны для изучения механизмов внутриклеточного распределения, зиксина, поскольку дополняют имеющиеся в мировой литературе данные о влиянии гликозилирования, пальмитилирования и протеолиза на распределение этого белка между ядром и цитоплазмой. Ввиду очевидной связи зиксина с регуляцией клеточной подвижности, изучение его посттрансляционных модификаций и изменений их внутриклеточной локализации будет иметь большое значение для понимания взаимной регуляции двух важнейших процессов – морфогенеза и дифференцировки. Знания о функционировании mechanочувствительных белков имеют не только фундаментальную ценность, но и медицинское значение. Наши результаты содержат интересные дополнения к данным о регуляторных механизмах ядерно-цитоплазматического перемещения зиксина и раскрывают возможные последствия его aberrантных модификаций при злокачественных новообразованиях.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

Эксперименты на животных одобрены комиссией Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН по контролю и использованию лабораторных животных (протокол-заявка, рег. № 249 от 9 сентября 2024 г.)

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А. Паршина – создание генно-инженерных конструкций, микроинъекции в эмбрионы; Э.Д. Иванова – подготовка образцов, электрофорез и иммуноблоттинг; А.Г. Зарайский – работа с базами данных, корректировка текста статьи; Н.Ю. Мартынова – участие в экспериментах, написание статьи, общее руководство работой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nix D.A., Beckerle M.C. // J. Cell Biol. 1997. V. 138. P. 1139–1147.
<https://doi.org/10.1083/jcb.138.5.1139>
2. Cerisano V., Aalto Y., Perdichizzi S., Bernard G., Manara M.C., Benini S., Cenacchi G., Preda P., Lattanzi G., Nagy B., Knuutila S., Colombo M.P., Bernard A., Picci P., Scotlandi K. // Oncogene. 2004. V. 23. P. 5664–5674.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207741>
3. Ermolina L.V., Martynova N.Iu., Zaraiskii A.G. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2010. V. 36. P. 24–31.
<https://doi.org/10.1134/s1068162010010036>
4. Martynova N.Y., Parshina E.A., Zaraisky A.G. // FEBS J. 2023. V. 290. P. 66–72.
<https://doi.org/10.1111/febs.16308>
5. Martynova N.Y., Ermolina L.V., Ermakova G.V., Eroshkin F.M., Gyoeva F.K., Baturina N.S., Zaraisky A.G. // Dev. Biol. 2013. V. 380. P. 37–48.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.05.005>
6. Wu Z., Wu D., Zhong Q., Zou X., Liu Z., Long H., Wei J., Li X., Dai F. // Front. Mol. Biosci. 2024. V. 11. P. 1371549.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2024.1371549>

7. Wang Y.X., Wang D.Y., Guo Y.C., Guo J. // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2019. V. 23. P. 413–425.
https://doi.org/10.26355/eurrev_201901_16790
8. Rauskolb C., Pan G., Reddy B.V., Oh H., Irvine K.D. // PLoS Biol. 2011. V. 9. P. e1000624.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000624>
9. Suresh Babu S., Wojtowicz A., Freichel M., Birnbaum L., Hecker M., Cattaruzza M. // Sci. Signal. 2012. V. 5. P. ra91.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.2003173>
10. Beckerle M.C. // J. Cell Biol. 1986. V. 103. P. 1679–1687.
<https://doi.org/10.1083/jcb.103.5.1679>.
11. Crawford A.W., Beckerle M.C. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 5847–5853.
<https://doi.org/10.1083/jcb.119.6.1573>
12. Hirata H., Tatsumi H., Sokabe M.. // J. Cell Sci. 2008. V. 121. P. 2795–2804.
<https://doi.org/10.1242/jcs.030320>
13. Sadler I., Crawford A.W., Michelsen J.W., Beckerle M.C. // J. Cell Biol. 1992. V. 119. P. 1573–1587.
<https://doi.org/10.1083/jcb.119.6.1573>
14. Pérez-Alvarado G.C., Miles C., Michelsen J.W., Louis H.A., Winge D.R., Beckerle M.C., Summers M.F. // Nat. Struct. Biol. 1994. V. 1. P. 388–398.
<https://doi.org/10.1038/nsb0694-388>
15. Schmeichel K.L., Beckerle M.C. // Cell. 1994. V. 79. P. 211–219.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90191-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90191-0)
16. Schmeichel K.L., Beckerle M.C. // Biochem. J. 1998. V. 331. P. 885–892.
<https://doi.org/10.1042/bj3310885>
17. Beckerle M.C. // Bioessays. 1997. V. 19. P. 949–957.
<https://doi.org/10.1002/bies.950191104>.
18. Kadomas J.L., Beckerle M.C. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004. V. 5. P. 920–931.
<https://doi.org/10.1038/nrm1499>
19. Steele A.N., Sumida G.M., Yamada S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012. V. 422. P. 653–657.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.046>
20. Burridge K., Wittchen E.S. // J. Cell Biol. 2013. V. 200. P. 9–19.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201210090>
21. Mori M., Nakagami H., Koibuchi N., Miura K., Takami Y., Koriyama H., Hayashi H., Sabe H., Mochizuki N., Morishita R., Kaneda Y. // Mol. Biol. Cell. 2009. V. 20. P. 3115–3124.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e09-01-0046>
22. Call G.S., Chung J.Y., Davis J.A., Price B.D., Primavera T.S., Thomson N.C., Wagner M.V., Hansen M.D. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. V. 404. P. 780–784.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.058>
23. Moody J.D., Grange J., Ascione M.P., Boothe D., Bushnell E., Hansen M.D. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. V. 378. P. 625–628.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.11.100>
24. Fujita Y., Yamaguchi A., Hata K., Endo M., Yamaguchi N., Yamashita T. // BMC Cell Biol. 2009. V. 10. P. 6.
<https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-6>
25. Zhao Y., Yue S., Zhou X., Guo J., Ma S., Chen Q. // J. Biol. Chem. 2022. V. 298. P. 101776.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101776>
26. Oku S., Takahashi N., Fukata Y., Fukata M. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 19816–19829.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.431676>
27. Ivanova E.D., Parshina E.A., Zaraisky A.G., Martynova N.Y. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2024. V. 50. P. 723–732.
<https://doi.org/10.1134/s1068162024030026>
28. Sabino F., Madzharova E., Auf dem Keller U. // Cell Death Dis. 2020. V. 11. P. 674.
<https://doi.org/10.1038/s41419-020-02883-2>
29. Martynova N.Y., Eroshkin F.M., Ermolina L.V., Ermakova G.V., Korotaeva A.L., Smurova K.M., Goyeva F.K., Zaraisky A.G. // Dev. Dyn. 2008. V. 237. P. 736–749.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21471>
30. Martynova N.Y., Parshina E.A., Zaraisky A.G. // STAR Protoc. 2021. V. 2. P. 100449.
<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100449>
31. Linder M.E., Deschenes R.J. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007. V. 8. P. 74–84.
<https://doi.org/10.1038/nrm2084>
32. el-Husseini Ael-D, Bredt D.S. // Nat. Rev. Neurosci. 2002. V. 3. P. 791–802.
<https://doi.org/10.1038/nrn940>
33. Fukata Y., Fukata M. // Nat. Rev. Neurosci. 2010. V. 11. P. 161–175.
<https://doi.org/10.1038/nrn2788>.
34. Zachara N.E., Hart G.W. // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1673. P. 13–28.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.03.016>
35. Xu Z., Isaji T., Fukuda T., Wang Y., Gu J. // J. Biol. Chem. 2019. V. 294. P. 3117–3124.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005923>

The Effect of Modification on the Intracellular Distribution of Zyxin in *Xenopus laevis* Embryos

E. A. Parshina*, E. D. Ivanova**, A. G. Zaraisky*, and N. Y. Martynova*,[#]

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

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

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

Zyxin is a conserved mechanosensitive LIM domain protein that regulates F-actin filament assembly at cell junctions. In response to cell stretching, zyxin can either move into the nucleus and regulate gene expression, or it can exit the nucleus. Zyxin is recognized as an oncomarker, which makes studying its modifications and how it moves between nucleus and cytoplasm useful for diagnosing diseases at the molecular level. An effect of site-directed mutagenesis at palmitylation sites, O-GlcNAcylation sites, and amino acids at the *N*- and *C*-terminus on the ability of zyxin to enter the nucleus was demonstrated using *Xenopus laevis* embryos at gastrula stage. By adding the Flag epitope to the *C*-terminus of the zyxin molecule, it was found that the zyxin molecule loses its ability to move into the nucleus as a result. When palmitylation sites are targeted for mutation, the amount of zyxin in the nucleus decreases, whereas when amino acids are mutated to cause O-GlcNAcylation, the amount of zyxin increases. The first data obtained on the influence of these modifications on the movement of zyxin support global research on mechanisms behind changes in the localization of mechanosensitive proteins of the zyxin family. Since disruption of their intracellular localization leads to cancerous tumors and cardiovascular diseases, these investigations have both fundamental and medical importance.

Keywords: protein isoforms, development, intracellular localization, zyxin, modifications, proteolysis