



УДК 577.218

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ ЦИТОСКЕЛЕТНОГО БЕЛКА ЗИКСИНА *Xenopus laevis*

© 2025 г. Э. Д. Иванова*, Р. Х. Зиганшин**, Е. А. Паршина**,
А. Г. Зарайский**, Н. Ю. Мартынова**, #

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

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

Поступила в редакцию 10.12.2024 г.

После доработки 22.12.2024 г.

Принята к публикации 24.12.2024 г.

Цитоскелетный LIM-доменный белок зиксин активно изучается в связи с его вовлеченностью в основные процессы, происходящие в клетке – от механосенсорной функции и регуляции полимеризации актина в клеточных контактах до участия в регуляции генной экспрессии в ядре. Нарушение экспрессии и процессинга зиксина наблюдается при канцерогенезе и приводит к развитию сердечно-сосудистых заболеваний. Для зиксина млекопитающих известно, что этот белок подвергается посттрансляционным модификациям, которые регулируют его активность и внутриклеточную локализацию. Поскольку зиксин эволюционно высококонсервативный белок, мы провели поиск посттрансляционных модификаций гомолога зиксина из шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* с использованием хромато-масс-спектрометрии. Для поиска модифицированных пептидов был применен метод обогащения при помощи коиммунопреципитации эндогенного зиксина из лизатов клеток зародышей на стадии гаструлы. В результате были обнаружены неизвестные ранее модификации этого белка – N-концевое ацетилирование по позиции Met1 и фосфорилирование по Ser197 и Ser386. Для идентификации изоформ зиксина с различной электрофоретической подвижностью было проведено разделение с помощью электрофореза в ПААГ. Зиксин был обнаружен в полосах с электрофоретической подвижностью 70 и 105 кДа. Таким образом, в работе получены новые данные о посттрансляционных модификациях зиксина из *X. laevis*. Поскольку дефекты механической передачи сигнала связаны с нарушениями развития, онкогенезом и метастазированием, изучение модификаций и процессинга механочувствительного белка зиксина на модельном организме *X. laevis* открывает возможности для диагностических исследований на молекулярном уровне, которые в дальнейшем могут быть использованы для определения перспективности применения лекарственных препаратов в фармакологии.

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

DOI: 10.31857/S0132342325030027, **EDN:** KPZTMP

ВВЕДЕНИЕ

Зиксин – это LIM-доменный белок, преимущественно локализованный в местах межклеточной

адгезии, где формируются белковые комплексы, регулирующие динамику цитоскелета и передачу сигналов [1]. Кроме этого, зиксин участвует в механотрансдукции [2, 3], поскольку может пере-

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

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

мещаться между ядром и местами клеточной адгезии [4], хотя основные механизмы, приводящие к изменению его локализации, неясны. Известно, что зиксин млекопитающих – фосфопротеин.

Так, фосфорилирование по Ser142 модулирует его активность, разрушая закрытую конформацию молекулы зиксина по типу “голова–хвост” [5]. Кроме этого, показано, что зиксин фосфорилируется киназой CDK1 во время митоза по позициям S281 и S344. В работе [6] было исследовано влияние гликозилирования на внутриклеточную локализацию фосфорилированного зиксина за счет усиления его взаимодействия с белком 14-3-3γ из семейства фосфосерин/треонин-связывающих ядерных белков. Показано, что белок 14-3-3γ взаимодействует с фосфорилированным зиксином, и это взаимодействие способствует перемещению зиксина в ядро, где он оказывает негативное влияние на экспрессию генов апоптоза [7].

Зиксин – это эволюционно консервативный белок, демонстрирующий значительную консервативность своих основных доменов среди эукариотических организмов [8]. Все гомологи зиксина содержат три LIM-домена на C-конце, которые необходимы для его локализации в местах фокальной адгезии [9, 10], последовательность, необходимую для взаимодействия α-актинином [11, 12], и четыре пролин-богатых последовательности, которые опосредуют взаимодействие зиксина с регуляторами актина Mena и VASP [13–15] на N-конце. В центральной части зиксин млекопитающих содержит две богатые лейцином последовательности ядерного экспорта [1, 16].

Консервативность этого белка дает возможность использовать модельный организм, эмбрионы шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, для определения его роли в эмбриогенезе. Ранее было показано, что зиксин – модулятор определенных сигнальных путей, важных для эмбриогенеза [17–24]. Зиксин может напрямую связываться с транскрипционными эффекторами этих путей, например, с эффекторами пути Shh Gli1 и Zic1 [17], транскрипционным репрессором Xanfl1/Hesx1 [23] и фактором транскрипции Y-box Ybx1 [25].

Ранее при изучении зиксина из *X. laevis* мы идентифицировали несколько его эндогенных изоформ с различной электрофоретической подвижностью [26]. При помощи вестерн-блоттинга с использованием антител, специфичных к N- и

C-концевым участкам зиксина из *X. laevis*, мы в условиях разделения в ПААГ детектировали изоформы зиксина с молекулярной массой 105 и 70 кДа [26]. Но использование антител не дает возможности точно идентифицировать посттрансляционные модификации эндогенного белка. Для решения этой задачи мы дополнили изучение эндогенных форм зиксина исследованиями с применением хромато-масс-спектрометрии.

Масс-спектрометрические методы – мощная платформа для картирования модифицированного протеома. Протеомика на основе масс-спектрометрии требует высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией для идентификации и количественного определения пептидов и белков [27]. В очень кратком объяснении белки расщепляются до пептидов протеазой(ами) (в нашей работе трипсином), которые имеют определенные сайты протеолиза, tandemная масс-спектрометрия вызывает мономолекулярную диссоциацию ионов-предшественников (т.е. пептидов) и генерирует ассоциированные спектры массы к заряду ионов-продуктов [27]. Спектры загружаются в поисковые системы для сопоставления их с наиболее вероятным пептидом (совпадение пептидного спектра) [28, 29]. Картирование посттрансляционных модификаций требует обогащения модифицированных пептидов [30–32].

Немодифицированные пептиды более распространены, чем их модифицированные аналоги, которые могут теряться в сложной смеси (например, клеточные лизаты). Обогащение модифицированных пептидов создает проблемы для экспериментов с ограниченным материалом образца. Тем не менее использование метода обогащения на аффинной смоле со специфическими антителами позволило идентифицировать сайты фосфорилирования и ацетилирования эндогенного зиксина.

Целью представленной работы был поиск посттрансляционных модификаций механосенсорного белка зиксина *X. laevis*, поскольку эти модификации модулируют его функции и внутриклеточное распределение. Знания о молекулярных механизмах, которые контролируются механочувствительными белками, имеют не только фундаментальную ценность, но и медицинское значение. Нарушения в процессинге и локализации таких белков при-

водят к развитию целого ряда заболеваний человека – прежде всего раковых опухолей и патологии сердечно-сосудистой системы. Также актуальная проблема биоинженерии – создание клеточных структур определенной геометрии, где полученные знания о функционировании регуляторных белков цитоскелета будут иметь огромное значение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подтверждение наличия изоформ зиксина после разделения в ПААГ. Для изучения изоформ зиксина с разной электрофоретической подвижностью было проведено разделение белков в 10%-ном ПААГ в присутствии SDS-Na в образцах, полученных из лизатов клеток эмбрионов *X. laevis* на стадии гастрюлы (11-я стадия). Полосы, соответствующие изоформам зиксина, идентифицировали методом вестерн-блоттинга с использованием специфических антител к С-концевой области зиксина, полученных ранее [23, 26]. При этом половину геля окрашивали раствором кумасси, а другую использовали для вестерн-блоттинга. Идентифицированные

вестерн-блоттингом белковые полосы вырезали из геля, окрашенного кумасси, и подвергали пробоподготовке по методу трипсинолиза белков в геле (In-gel protein digestion with trypsin) [33]. В результате проведенного исследования было идентифицировано 23 пептида зиксина в полосе с электрофоретической подвижностью 105 кДа и только 3 пептида в полосе 70 кДа. По отношению площадей пиков пептидов ANLQSGEPE-NEPTVEVQVER и HEAPPPTVPSGGR к сумме площадей всех пептидных пиков в образцах, выраженных в процентах, видно, что в полосе 105 кДа на порядок больше обоих пептидов по сравнению с полосой 70 кДа (рис. 1а). Это исследование было проведено в связи с тем, что расчетная масса зиксина составляет 70725.45 Да, но содержание зиксина в полосе 105 кДа на порядок больше, чем в полосе 70 кДа, что подтверждается также данными по интенсивности полос в вестерн-блоттинге (рис. 1б, 1в). Таким образом, было подтверждено, что полоса 105 кДа содержит основную форму зиксина.

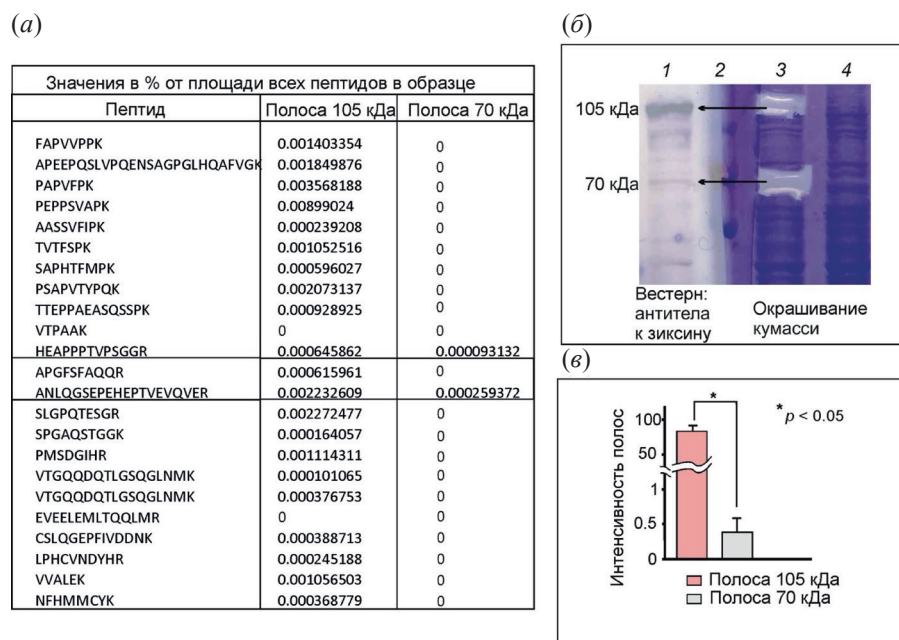


Рис. 1. Определение изоформ зиксина с различной электрофоретической подвижностью. (а) – Пептиды, которые были идентифицированы в полосах с электрофоретической подвижностью 105 кДа (23 пептида) и 70 кДа (2 пептида). Количество пептидов оценивали по отношению площади хроматографического пика на масс-спектре (Area) к сумме площадей всех идентифицированных пиков в образце, в долях процентов; (б) – электрофорез лизата зародышей в 10%-ном ПААГ-SDS с окрашиванием ½ геля кумасси и вестерн-блоттингом с окрашиванием антителами к зиксину. Вырезаны полоски геля, соответствующие окрашенным антителами к зиксину полосам, соответствующим молекулярной массе 70 и 105 кДа. Дополнительные полосы на вестерн-блоттинге – фон; (в) – количественная оценка распределения зиксина по полосам после вестерн-блоттинга (программа Image G). Процентное содержание (а) у идентифицированных в полосе 70 кДа пептидов на порядок меньше, чем у аналогичных пептидов в полосе 105 кДа, что совпадает с данными программы Image G по оценке интенсивности полос 70 и 105 кДа в вестерн-блоттинге.

Изоформы зиксина после иммунопреципитации с антителами к С-зиксину. Для поиска возможных посттрансляционных модификаций зиксина было проведено обогащение образцов для масс-спектрометрического анализа с использованием коиммунопреципитации из лизатов зародышей. Коиммунопреципитацию проводили по разработанному ранее методу [23] с использованием носителя с иммобилизованными антителами к С-концевой части зиксина. Для предотвращения протеолиза использовали ингибиторы протеаз (Sigma, США), а для идентификации сайтов фосфорилирования в молекуле зиксина – ингибиторы фосфатаз (Sigma). Аликвоту носителя с осажденным комплексом белков, ~20 мкг тотального белка, использовали для расщепления трипсином и подготовки образцов по методу [35].

После проведения масс-спектрометрического анализа были идентифицированы пептиды, содержащие модифицированные аминокислотные остатки. Мы обнаружили три модифицированных пептида, которые включали ацетилирование по Met1 и фосфорилирование по Ser197 и Ser339. Все эти модификации найдены впервые для молекулы зиксина из *X. laevis* и представляют большую ценность для изучения функционирования этого белка.

Добавление ацетильной группы к аминокислотам в начале белка (известное как *N*-концевое ацетилирование, *N*-terminal acetylation, Nt-acetylation) имеет решающее значение для поддержания гомеостаза белка и функционирования клеток. Эта модификация происходит более чем в 50% белков в эукариотических организмах и при неправильной регуляции может привести к раку, гипертонии, нейродегенерации и другим заболеваниям. *N*-Концевое ацетилирование не только нацеливает белки на деградацию через определенный сигнальный путь, но также регулирует сворачивание белка, клеточную локализацию и активность. Эта необратимая модификация также может защищать белки от других механизмов деградации. Ингибирование взаимодействий белков, зависящих от *N*-концевого ацетилирования, может быть полезной стратегией для регулирования стабильности белка [36, 37]. Учитывая факт, что уровень экспрессии зиксина оказывает влияние на такие важные процессы, как дифференцировка, апоптоз, миграция клеток, идентификация его *N*-концевого ацетилирования

открывает дополнительные перспективы для изучения его активности.

Что касается фосфорилирования, то это наиболее изученная модификация зиксина у млекопитающих. Известно, что фосфорилирование зиксина по аминокислотному остатку Ser142 [5] приводит к нарушению внутримолекулярного взаимодействия *N*- и *C*-концевых доменов зиксина по типу “голова–хвост” и открывает *N*-концевую пролин-богатую и Lim-доменную области для связывания с белками-партнерами. Было показано также, что зиксин в клетках линий HEK293T, HeLa, RKO, SW480 и DLD-1 фосфорилируется по Ser281 и Ser344 во время метафазы митоза [6].

Поскольку для зиксина *X. laevis* анализ *in silico* показал, что в его молекуле имеется 35 потенциальных участков фосфорилирования (по данным базы PhosphoSitePlus®, <https://www.phosphosite.org/>), поиск реальных сайтов фосфорилирования был необходимым этапом для дальнейшего изучения этого белка.

Для направленного обогащения и очистки зиксина из лизата зародышей была использована аффинная смола протеин А сефароза с иммобилизованными поликлональными антителами к Lim-доменной области зиксина. В результате обогащения образца из лизатов на стадии ранней гастротомии в присутствии ингибиторов фосфатаз удалось идентифицировать фосфорилирование по Ser198 и Ser386.

На рис. 2 видно, что помимо фосфорилированных пептидов присутствуют и нефосфорилированные. Следует отметить, что участок последовательности, окружающий S386-RSPGA, идентичен участку, окружающему S344-RSPGA в клетках человека [6]. Высокая консервативность этих последовательностей говорит о том, что данная модификация может иметь схожий механизм возникновения. Можно сделать предположение, что эта модификация возникает при митозе, как и в случае зиксина в клеточных линиях человека [6].

Для фосфорилирования по Ser197 не удалось пока найти сходной последовательности у гомологов зиксина. Возможно, это фосфорилирование Ser197 у *X. laevis* играет роль, сходную с S142 у зиксина млекопитающих [5], и принимает участие в регуляции активности зиксина за счет влияния на внутримолекулярное взаимодействие между его *N*-концевой частью и *C*-концевой Lim-доменной областью.

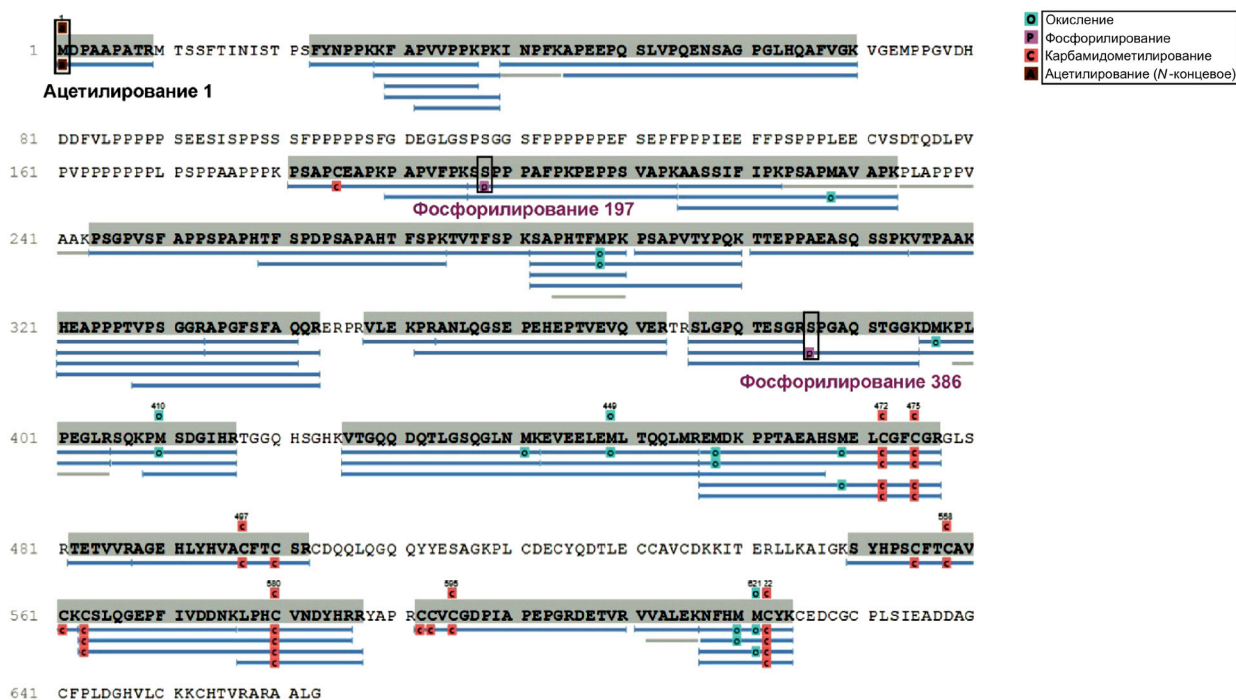


Рис. 2. Схема расположения идентифицированных модифицированных остатков в молекуле зиксина. На схеме в рамке отображены модифицированные аминокислотные остатки Met1, Ser197 и Ser386. Также на схеме присутствуют постоянные модификации, необходимые для анализа: Cys – карбамидометилирование (C на схеме), а также переменные модификации: окисление Met (O на схеме).

Анализ распределения фосфорилированных форм зиксина между ядром и цитоплазмой. Для исследования распределения зиксина между цитоплазмой и ядром лизат из клеток зародышей был разделен на ядерную и цитоплазматические фракции по методике [26] и также обогащен при помощи осаждения на носителе с антителами к зиксину. В результате масс-спектрального анализа обогащенной фракции из цитоплазмы было обнаружено два модифицированных пептида, содержащих ацетилированный Met1 и фосфорилированный Ser197. Пептид 1–9 а.о. был только в модифицированной форме: M(+AC)DPAAPATR. Пептид 197–214 а.о. представлен как модифицированной формой (SS(+P)PPPAFPKPEPSPVAPK), так и немодифицированной (SSPPPAFPKPEPPSVAPK).

Модификация S386 идентифицирована в общем лизате до разделения фракций, содержащий ее пептид представлен как в модифицированной (SLGPQTESGRS(+P)PGAQSTGGK), так и в немодифицированной форме (SLGPQTESGRSPGAQSTGGK). Учитывая данные работы по

зиксину млекопитающих [6], где показано, что модифицированный по S386 пептид появляется только в процессе митоза, можно предположить, что эта модификация появляется только в делящихся клетках, и при разделении ядра и цитоплазмы зиксин с этой модификацией теряется, поскольку такие клетки не имеют четкого разграничения компартментов на ядро и цитоплазму. Следует отметить, что в ядерной фракции нам не удалось найти модифицированные пептиды зиксина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение зародышей, разделение лизата на ядерную и цитоплазматическую фракции и подготовка образцов для вестерн-блот-анализа. Зародышей *X. laevis* получали в результате оплодотворения *in vitro* по методике, разработанной ранее [25, 26]. Зародышей инкубировали до стадии гаструлы (12-я стадия) в растворе 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). Зародышей гомогенизировали пипетированием, получен-

ный грубый лизат центрифугировали 30 мин при 15 000 g, отбирали супернатант и готовили образцы для электрофореза по стандартной методике.

Иммунопреципитация зиксина из лизата зародышей. Иммунопреципитацию проводили по методике, разработанной нами ранее [23]. Для иммунопреципитации эмбрионы (40 эмбрионов) на стадии ранней гаструлы разделяли на две части: одну часть, 20 эмбрионов, гомогенизировали на льду путем пипетирования в фосфатном буферном растворе для иммунопреципитации (IPB 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 8.1 mM Na_2HPO_4), 10 мкл на эмбрион, дополненным 1% Тритоном X-100, ингибиторами протеазы 50× (Sigma, США) и ингибиторами фосфатаз 100× (Sigma), 10 мкл на эмбрион. Центрифугировали при 12 000 g в течение 30 мин при 4°C для удаления желтка. Полученный лизат объемом 200 мкл смешивали с протеин А сефарозой с антителами к С-зиксину и инкубировали в течение 3 ч при 4°C на вращающемся ротаторе, затем проводили 3 промывки буфером IPB и 3 промывки фосфатным буфером PBS. Аликвоту смолы с осажденным белком (~20 мкг тотального белка) отбирали для масс-спектрометрического анализа.

Другую часть зародышей гомогенизировали, грубый гомогенат разделяли на ядерную и цитоплазматическую фракции, как описано в работе [25]. Разделенные на фракции лизаты подвергали иммунопреципитации и анализировали, как описано выше для общего лизата.

SDS-PAGE. Образцы анализировали с помощью SDS-PAGE в 10%-ных гелях по методу Лэммли. Половину геля окрашивали раствором кумасси (Sigma, США). Другую половину геля подвергали электроблоттингу на PVDF-мембране (Millipore Corp. Inc., Франция), как описано в работе [26]. В качестве первичных антител использовали моноспецифичные поликлональные антитела кролика к С-зиксину, в качестве вторичных антител – козий антикроличий Fab-фрагмент антитела, конъюгированный с щелочной фосфатазой (Sigma, США). Для детекции использовали стабилизированный субстрат для щелочной фосфатазы Western Blue (Promega, США).

При помощи предокрашенных стандартов молекулярных весов, нанесенных посередине геля, совмещали окрашенный кумасси гель и окрашенную методом вестерн блоттинга мем-

брану, из геля вырезали полосы, специфично детектированные на мембране антителами к зиксину.

Расщепление белков в геле трипсином. Расщепление белков в геле проводили, как описано в работе [33], с небольшими модификациями. Вырезанные белковые полосы разрезали на кубики (~1 × 1 мм), обесцвечивали 50%-ным ацетонитрилом в 200 mM бикарбонате аммония в течение 30 мин, дегидратировали чистым ацетонитрилом в течение 15 мин и высушивали с помощью вакуумного концентратора SpeedVac в течение 10 мин. Для восстановления в геле и алкилирования белков в высушенные кусочки геля добавляли раствор, содержащий 50 mM бикарбонат аммония, 10 mM TCEP и 20 mM 2-хлор-ацетамида. Образцы инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Через 1 ч избыток растворителя удаляли и добавляли достаточно трипсинового буфера (50 mM раствор бикарбоната аммония содержал 15 нг/мл трипсина) для покрытия кусочков геля и оставляли его инкубироваться на ночь при 37°C в термостате с циркуляцией воздуха. Для элюирования пептидов к образцу добавляли 120 мкл 0.2%-ной ТФУ в воде (v/v) и инкубировали его в течение 1.5 ч при комнатной температуре. Раствор пептида переносили в чистую пробирку, высушивали в вакууме и хранили при -80°C. Перед анализом пептиды растворяли в 15 мкл загрузочного раствора (2% ACN, 98% H_2O и 0.1% ТФУ).

Гидролиз белков трипсином. Аликвоты раствора, содержащие 20 мкг белка, высушивали досуха на центрифужном вакуумном концентраторе SpeedVac (Savant, Франция) и растворяли в 20 мкл буферного раствора, содержащего 100 mM Трис (pH 8.5), 1% дезоксихолата натрия, 10 mM TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine) и 20 mM 2-CAA (2-хлороацетамид), прогревали в течение 10 мин при 85°C, охлаждали до комнатной температуры. К раствору белка добавляли 0.4 мкг трипсина в 10 мкл 100 mM Трис (pH 8.5) и оставляли инкубироваться при 37°C на ночь. По окончании инкубации к реакционной смеси добавляли равный объем 2%-ной ТФУ, пептиды обессоливали на микроколонке SDB-RPS StageTip, изготовленной из наконечника для автоматической пипетки на 200 мкл и трех кусочков мембраны SDB-RPS (3 M, США), вырезанных иглой калибром 16 [35]. Раствор пептидов наносили на

микроколону центрифугированием при 300 g, промывали смесью растворителей 50 мкл 1%-ной ТФУ : 50 мкл этилацетата (3 раза), 50 мкл 0.2%-ной ТФУ и элюировали 50 мкл раствора, содержащего 5% гидроксида аммония и 80% ацетонитрила в воде. Элюат высушивали досуха и хранили при -80°C . Перед анализом пептиды растворяли в 40 мкл раствора, содержащего 0.1% ТФУ и 2% ацетонитрила в воде.

Хромато-масс-спектрометрический анализ.

Образцы загружали на изготовленную в лаборатории предколону 50×0.1 мм, упакованную сорбентом Inertsil ODS3 $3 \mu\text{m}$ (GL Sciences), в растворе, содержащем 2% ацетонитрила, 98% H_2O , 0.1% ТФУ, при скорости потока 10 мкл/мин и разделяли при комнатной температуре на колонке из плавленного кварца 300×0.1 мм с эмиттером, изготовленной на приборе P2000 Laser Puller (Sutter, США) и упакованной в лаборатории сорбентом Reprosil PUR C18AQ 1.9 (Dr. Maisch HPLC, США). Обратнo-фазовую хроматографию проводили на хроматографе Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific, США), соединенном с масс-спектрометром Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) посредством наноэлектроспрейного источника (Thermo Fisher Scientific). Для хроматографического разделения пептидов использовали систему растворителей А (99.9% воды, 0.1% муравьиной кислоты) и Б (19.9% воды, 0.1% муравьиной кислоты, 80% ацетонитрила). Пептиды элюировали с колонки линейным градиентом: 3–30% Б за 50 мин, 30–55% Б за 10 мин, 55% Б за 2 мин, 55–99% Б за 0.1 мин, 99% Б за 2 мин, 99–3% Б за 0.1 мин при скорости потока 500 нл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме DDA (TopN = 10) со следующими настройками прибора: MS1-сканирование: разрешение 70 000, диапазон сканирования: 200–1600 m/z , максимальное время инъекции ионов – 35 мс, уровень AGC – 3×10^6 , MS2-сканирование: разрешение 17 500, HCD-фрагментация с энергией 30%, максимальное время инъекции ионов – 30 мс, уровень AGC – 1×10^5 .

Анализ масс-спектрометрических данных.

Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме DDA (TopN = 10). Масс-спектрометрические данные анализировали при помощи компьютерной программы Peaks studio 10.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Канада) [34]. Идентификацию белков проводили посредством корреляции тан-

демных масс-спектров с базой данных белковых последовательностей *X. laevis* UniprotKB (2024.01.21) со следующими параметрами: постоянная модификация Cys – карбамидометилирование, переменные модификации – деамидирование Asn/Gln и окисление Met, допустимый уровень ложноположительных идентификаций пептидов – 0.01, специфичность протеазы – C-конец Arg и Lys (при поиске в базе данных допускалось до двух пропущенных сайтов гидролиза). При идентификации пептидов разрешалось отклонение экспериментально полученной массы пептида от его теоретической массы до 10 м.д., а отклонение массы фрагментов – до 0.05 Да.

Все эксперименты по хромато-масс-спектрометрическому анализу проводили в более чем трехкратной повторности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная работа – продолжение исследования по изучению белка зиксина из шорцевой лягушки *X. laevis*. Ранее методом вестерн-блоттинга с использованием специфических антител мы обнаружили, что зиксин в эмбрионах *X. laevis* представлен несколькими изоформами с различной электрофоретической подвижностью. Поскольку для гомологов зиксина из других позвоночных известно, что этот белок – фосфопротеин, основной задачей был поиск возможных позиций фосфорилирования для зиксина из *X. laevis*. В результате применения метода хромато-масс-спектрометрии с обогащением образцов методом коиммунопреципитации мы идентифицировали, во-первых, N-концевое ацетилирование зиксина по Met1, во-вторых, два сайта фосфорилирования по Ser197 и Ser386. Следует отметить, что в мировой литературе мало данных об ацетилировании зиксина, кроме статьи о его взаимодействии с NAD^+ -зависимой деацетилазой SIRT1 [38]. Показано, что SIRT1 модулирует функции различных ключевых белков-мишеней посредством деацетилирования и участвует в выживании клеток, дифференцировке и метаболизме, играет важную роль в нейродегенерации. Возможно, ацетилирование играет важную роль в функционировании зиксина, и поэтому определение позиции присоединения ацетильной группы открывает новые возможности для изучения этого белка методом направленного мутагенеза на модели эмбрионов

X. laevis. В-третьих, идентификация двух сайтов фосфорилирования по Ser197 и Ser386 также позволяет применить методы направленного мутагенеза для изучения локализации и функционирования этого механочувствительного белка-переносчика информации от цитоскелетных структур к ядерному аппарату транскрипции.

Следует отметить, что при изучении эндогенных белков возникают серьезные трудности, связанные с небольшими количествами исследуемого материала, проблемами при выделении без потери модификаций и возможного протеолиза. Но такое изучение имеет огромное преимущество, поскольку данные, полученные на уровне эндогенных белков, несомненно, наиболее достоверны по сравнению с использованием экзогенных гибридных и мутированных версий.

Исследование механочувствительного цитоскелетного зиксина, способного, во-первых, регулировать дифференцировку, во-вторых, влиять на миграционные свойства клеток за счет изменения состояния межклеточных контактов и в-третьих, имеющего антиапоптотическую активность в поврежденных тканях, представляет собой приоритетную задачу биомедицины. Зиксин уже признан известным онкомаркером, изменение его внутриклеточной локализации используется для прогнозирования эффективности терапии, что, несомненно, важно для поиска и определения перспективности применения лекарственных препаратов в фармакологии.

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

Протокол исследования на животных был одобрен наблюдательным советом (или этическим комитетом) Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова (Москва, Россия, код протокола IACUC 229 от 1 февраля 2018 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – НЮМ, РХЗ; экспериментальные работы – ЭДИ, НЮМ, РХЗ, ЕАП; написание статьи – НЮМ; анализ данных – НЮМ; администрирование проекта – НЮМ, АГЗ.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Beckerle M.C.* // Bioessays. 1997. V. 19. P. 949–957. <https://doi.org/10.1002/bies.950191104>
2. *Hirata H., Tatsumi H., Sokabe M.* // Commun. Integr. Biol. 2008. V. 1. P. 192–195. <https://doi.org/10.4161/cib.1.2.7001>
3. *Hirata H., Tatsumi H., Sokabe M.* // J. Cell Sci. 2008. V. 121. P. 2795–2804. <https://doi.org/10.1242/jcs.030320>
4. *Nix D.A., Beckerle M.C.* // J. Cell Biol. 1997. V. 138. P. 1139–1147. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.5.1139>
5. *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>
6. *Zhou J., Zeng Y., Cui L., Chen X., Stauffer S., Wang Z., Yu F., Lele S.M., Talmon G.A., Black A.R., Chen Y., Dong J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. P. E6760–E6769. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800621115>
7. *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>
8. *Siddiqui M.Q., Badmalia M.D., Patel T.R.* // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 2647. <https://doi.org/10.3390/ijms22052647>
9. *Nix D.A., Fradelizi J., Bockholt S., Menichi B., Louvard D., Friederich E., Beckerle M.C.* // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 34759–34767. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102820200>
10. *Uemura A., Nguyen T.N., Steele A.N., Yamada S.* // Biophys. J. 2011. V. 101. P. 1069–1075. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.08.001>
11. *Drees B.E., Andrews K.M., Beckerle M.C.* // J. Cell Biol. 1999. V. 147. P. 1549–1560. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.7.1549>
12. *Li B., Trueb B.* // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 33328–33335. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100789200>

13. Drees B., Friederich E., Fradelizi J., Louvard D., Beckerle M.C., Golsteyn R.M. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 22503–22511.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M001698200>
14. Golsteyn R.M., Beckerle M.C., Koay T., Friederich E. // J. Cell. Sci. 1997. V. 110. P. 1893–1906.
<https://doi.org/10.1242/jcs.110.16.1893>
15. Smith M.A., Hoffman L.M., Beckerle M.C. // Cell Biol. 2014. V. 24. P. 575–583.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.04.009>
16. Martynova N.Y., Parshina E.A., Ermolina L.V., Zarskiy A.G. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018. V. 504. P. 251–256.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.164>
17. Martynova N.Y., Ermolina L.V., Ermakova G.V., Eroshkin F.M., Gyoeva F.K., Baturina N.S., Zarskiy A.G. // Dev. Biol. 2013. V. 380. P. 37–48.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.05.005>
18. Li N., Goodwin R.L., Potts J.D. // Microsc. Microanal. 2013. V. 19. P. 842–854.
<https://doi.org/10.1017/S1431927613001633>
19. 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. // Mol. Cell Biol. 2003. V. 23. P. 70–79.
<https://doi.org/10.1128/MCB.23.1.70-79.2003>
20. 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>
21. Gaspar P., Holder M.V., Aerne B.L., Janody F., Tapon N. // Curr. Biol. 2015. V. 25. P. 679–689.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.010>
22. Martynova N.Y., Eroshkin F.M., Ermolina L.V., Ermakova G.V., Korotaeva A.L., Smurova K.M., Gyoeva F.K., Zarskiy A.G. // Dev. Dyn. 2008. V. 237. P. 736–749.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21471>
23. Martynova N.U., Ermolina L.V., Eroshkin F.M., Zarayskiy A.G. // Bioorg. Khim. 2015. V. 41. P. 744–748.
<https://doi.org/10.1134/s1068162015060102>
24. 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., Zarskiy A.G., Martynova N.Y. // Cell Rep. 2020. V. 33. P. 108396.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108396>
25. Ivanova E.D., Parshina E.A., Zarskiy A.G., Martynova N.Y. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2024. V. 50. P. 723–732.
<https://doi.org/10.1134/S1068162024030026>
26. Aebersold R., Mann M. // Nature. 2003. V. 422. P. 198–207.
<https://doi.org/10.1038/nature01511>
27. Mann M., Wilm M. // Anal. Chem. 1994. V. 66. P. 4390–4399.
<https://doi.org/10.1021/ac00096a002>
28. Eng J.K., Searle B.C., Clauser K.R., Tabb D.L. // Mol. Cell Proteomics. 2011. V. 10. P. R111.009522.
<https://doi.org/10.1074/mcp.R111.009522>
29. Mann M., Ong S.E., Grønborg M., Steen H., Jensen O.N., Pandey A. // Trends Biotechnol. 2002. V. 20. P. 261–268.
[https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(02\)01944-3](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(02)01944-3)
30. Groen A., Thomas L., Lilley K., Marondedze C. // Methods Mol. Biol. 2013. V. 1016. P. 121–137.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-441-8_9
31. Maynard J.C., Chalkley R.J. // Mol. Cell Proteomics. 2021. V. 20. P. 100031.
<https://doi.org/10.1074/mcp.R120.002206>
32. Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J.V., Mann M. // Nat. Protoc. 2006. V. 1. P. 2856–2860.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>
33. Ma B., Zhang K., Hendrie C., Liang C., Li M., Doherty-Kirby A., Lajoie G. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2003. V. 17. P. 2337–2342.
<https://doi.org/10.1002/rcm.1196>
34. Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y. // Nat. Protoc. 2007. V. 2. P. 1896–1906.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.261>
35. Nguyen K.T., Mun S.H., Lee C.S., Hwang C.S. // Exp. Mol. Med. 2018. V. 50. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1038/s12276-018-0097-y>
36. Arnaudo N., Fernández I.S., McLaughlin S.H., Peak-Chew S.Y., Rhodes D., Martino F. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2013. V. 20. P. 1119–1121.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2641>
37. Fujita Y., Yamaguchi A., Hata K., Endo M., Yamaguchi N., Yamashita T. // BMC Cell Biol. 2009. V. 27. P. 10–16.
<https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-6>

Mass Spectrometric Analysis of *Xenopus laevis* Cytoskeletal Protein Zyxin Post-Translational Modifications

E. D. Ivanova*, R. H. Zyganshin**, E. A. Parshina**,
A. G. Zarskiy**, and N. Y. Martynova** #

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

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

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

In addition to its involvement in fundamental cellular processes, zyxin, a LIM-domain protein in the cytoskeletal system, is actively studied because it plays an important role in mechanosensory functions, actin polymerization regulation at cell junctions, as well as gene expression regulation. The disruption of zyxin expression and processing has been associated with carcinogenesis and cardiovascular disease. Zyxin plays an important role in the invasion and metastasis of tumors. The post-translational modification of zyxin in mammals regulates its activity and subcellular location. Given that zyxin is an evolutionarily highly conserved protein, we conducted a search for post-translational modifications of the zyxin homolog from *Xenopus laevis* using chromatographic mass spectrometry. To identify modified peptides, an enrichment method was employed using co-immunoprecipitation of endogenous zyxin from gastrula-stage embryonic cell lysates. As a result, previously unknown modifications of this protein were discovered, specifically *N*-terminal acetylation at methionine position 1 and phosphorylation at Ser197 and Ser386. To identify zyxin isoforms with different electrophoretic mobilities, separation was performed using polyacrylamide gel electrophoresis. Zyxin was found in bands with electrophoretic mobilities of 70 and 105 kDa. Thus, this study presents entirely new data on the post-translational modifications of zyxin from *X. laevis*. Since defects in mechanical signal transduction are associated with developmental disorders, oncogenesis, and metastasis, the study of mechanosensitive protein zyxin modifications and processing on the model organism *X. laevis* opens up opportunities for diagnostic studies at the molecular level, which can be used in the future to determine drugs use prospective in pharmacology.

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