



# ЦИТОСКЕЛЕТНЫЙ РЕГУЛЯТОР ЗИКСИН СТИМУЛИРУЕТ ТРАНСЛОКАЦИЮ ЭФФЕКТОРА НИРРО-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ – YAP – В ЯДРА КЛЕТОК ЭМБРИОНА ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ

© 2025 г. Е. А. Паршина\*, #, Е. Е. Орлов\*, Е. Е. Воронежская\*\*,  
Н. Ю. Мартынова\*, А. Г. Зарайский\*, \*\*, \*\*\*

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

\*\* ФГБУН “Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова” РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26

\*\*\* Российской национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,  
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 29.04.2025 г.

После доработки 11.05.2025 г.

Принята к публикации 12.05.2025 г.

На сегодняшний день в научной литературе представлено ограниченное число данных о взаимосвязи механотрансдукции, связанной с изменениями уровня зиксина, и биохимической передачи сигнала транскрипционного фактора YAP. Исследования в этой области предполагают, что стресс-индуцированная реорганизация актинового цитоскелета, опосредованная зиксином, может играть ключевую роль в механотрансдукции YAP. Вместе с тем эти работы не предоставляют четких результатов относительно влияния зиксина на распределение YAP между ядром и цитоплазмой и регуляцию его активности. В данной статье мы исследовали влияние зиксина на транслокацию эффектора Hippo-сигнального пути – YAP – в ядра клеток раннего эмбриона шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Анализ ядерно-цитоплазматического распределения YAP с помощью иммуноблоттинга и иммуногистохимического окрашивания в сочетании с подавлением трансляции эндогенной мРНК зиксина морфолиновыми антисмысловыми олигонуклеотидами и сверхэкспрессией синтетической мРНК зиксина выявил стимулирующее влияние зиксина на транслокацию YAP в ядра клеток эмбрионов на стадии гаструлы, но не на стадиях бластулы и нейрулы. Аналогичный вывод был сделан в результате анализа влияния тех же изменений концентрации зиксина на экспрессию YAP-зависимого люциферазного репортера. На основании результатов нашего исследования, а также принимая во внимание известную роль зиксина как одного из механотрансдукторов, можно предположить, что этот белок участвует в механозависимой регуляции сигнального пути Hippo в эмбриональном развитии *X. laevis* на стадии гаструляции.

**Ключевые слова:** морфогенез, зиксин, YAP, механотрансдукция, *Xenopus laevis*

**DOI:** 10.31857/S0132342325050114

## ВВЕДЕНИЕ

В развивающихся тканях эмбриона и в зрелых тканях между клетками формируются механические напряжения. Чтобы минимизировать возможные повреждения клеток и поддерживать гомеостаз, важно, чтобы внешние силы были сбалансированы внутренними клеточными си-

лами. Достигается это за счет жесткости цитоскелета. Клетка воспринимает механические напряжения через фокальные и адгезионные контакты, что позволяет передавать их внутрь через актиновый цитоскелет. Благодаря этому клетка может адаптироваться к изменениям, регулируя свои сигнальные пути и механизмы сокращения.

Сокращения: МО – морфолиновые олигонуклеотиды.

# Автор для связи: (тел.: +7 (919) 767-36-56; эл. почта: lena\_parshina5@mail.ru).

Механические стимулы также способны воздействовать на экспрессию генов в живых клетках. При этом нарушения механорегуляции могут быть связаны с различными заболеваниями, такими как нейродегенерация [1], возможные дисфункции иммунной системы [2], гипертония [3] и поликистоз почек [4]. В последние годы возраст интерес к белкам, способным перемещаться от мембраны к ядру, которые могут детектировать механические сигналы и передавать их в ядро. Это может помочь координировать морфогенетические движения в эмбрионе с экспрессией генов и дифференцировкой клеток.

Исследования [5–7] показали, что белок зиксин обладает именно такими механочувствительными свойствами. При изменении механических нагрузок зиксин меняет свою локализацию в фокальных контактах: он выходит из них при снижении нагрузки и накапливается при растяжении субстрата [5]. Механические сигналы преобразуются в реакцию полимеризации актина через накопление зиксина, сопровождаемое рекрутированием Ena/VASP [5, 7]. В отличие от этого, зиксин-дефицитные клетки не реагируют на механическое натяжение [8], и нокдаун зиксина приводит к интегрин-независимой миграции клеток [5]. Таким образом, зиксин играет ключевую роль в механотрансдукции.

Изменения механических напряжений запускают множество сигнальных путей [9]. Один из наиболее изученных путей, обусловленных механическим стрессом, – это сигнальный путь Hippo/YAP. Накопление YAP в ядрах и его активация связаны с ростом органов, увеличением размера клеток, потерей контактного ингибирования, опухолевым ростом, клеточной пролиферацией и ингибированием апоптотических сигналов. Эти функции обеспечиваются за счет связывания YAP с TEAD, SMAD1/2/3, PPAR $\gamma$ , TBX5 и TTF1, где YAP/TAZ выступает в роли кофактора транскрипции, регулируя >400 генов [10, 11].

Путь Hippo у млекопитающих включает каскад киназ (MST 1/2, LATS 1/2), которые фосфорилируют YAP по Ser-127 (S127), что приводит к связыванию pYAP (фосфорилированного YAP) с белками 14-3-3 и удержанию в цитоплазме [12, 13]. Таким образом, при одинаковом общем количестве в клетке уровень транскрипционной активности YAP в итоге определяется соотношением его потенциально ядерной (нефосфорилированной) и

неядерной (фосфорилированной) форм. Сравнение транскрипционной активности YAP можно также проводить, сравнивая соотношение pYAP и общего YAP, уровень которых удобно оценивать с помощью специфических антител. При равном общем количестве YAP в двух клетках его транскрипционная активность будет больше в той клетке, в которой меньше уровень pYAP.

Уровень нефосфорилированной (т.е. транскрипционно активной) формы YAP регулируется также Rho-ГТФазами. Исследования показали, что токсин C3, ингибирующий Rho, выступает мощным подавляющим агентом активности YAP [14], а G-протеин-связанные рецепторы (GPCR) передают сигналы через YAP, что подтверждается работой Yu et al. [15]. Интересно, что ингибирование актина с помощью латрункулина А также снижает GPCR-опосредованную активность YAP, указывая на зависимость этой передачи сигналов от актинового цитоскелета [10].

На сегодняшний день в научной литературе имеется лишь немного информации о взаимосвязи между механотрансдукцией, которая обусловлена изменениями уровня зиксина, и биохимическими процессами сигнальной передачи, связанными с YAP. При этом имеющиеся данные довольно неоднозначны и противоречивы. Есть исследования, которые показывают, как зиксин связан с путем передачи сигналов Hippo. В частности, зиксин образует комплексы с Lats2, способствуя его деградации и активируя ядерную транслокацию YAP [16]. Также было показано, что зиксин опосредует передачу сигналов YAP через CDK8 в раковых клетках [17]. На *Drosophila melanogaster* показано, что зиксин взаимодействует с Ena и актиновым цитоскелетом, регулируя активность Yorkie, который служит ортологом YAP у млекопитающих [18].

Механические напряжения могут способствовать ядерной локализации YAP независимо от Lats и его фосфорилирования [14, 19]. Исследования Wen et al. показали, что нокдаун зиксина также подавляет ядерную транслокацию YAP при растяжении клеток, подчеркивая роль структурного актина и зиксина в анизотропной передаче сигналов YAP [20]. Это указывает на потенциальную роль реорганизации актина, индуцированной стрессом и опосредованной зиксином, в механотрансдукции YAP.

В недавней работе Zhang et al. исследовали влияние зиксина на регуляцию YAP в эмбриональных стволовых клетках мыши [21]. Их результаты подтверждают данные нашей работы, проведенной на эмбрионах *Xenopus laevis* и клетках HEK 293, где было показано, что зиксин отрицательно влияет на экспрессию генов плюрипотентности, ингибируя связывание мРНК этими генами с белком Ybx1, что приводит к деградации мРНК [22]. Также Zhang et al. выяснили, что сверхэкспрессия зиксина положительно влияет на формирование стрессовых волокон. В ответ на повышение жесткости происходит фосфорилирование YAP по S127, что приводит к снижению уровня Oct4. Это противоречит данным Wen et al., утверждающим, что механические напряжения, опосредуемые зиксином, не позволяют YAP транслюцироваться в ядро, а напротив, задерживают его в цитоплазме.

Однако исследования, описанные выше, проведенные в условиях клеточных культур, не способны дать уверенный ответ на вопрос о влиянии зиксина на распределение YAP между ядром и цитоплазмой, а также о регуляции активности последнего в клетках, находящихся в составе эмбриона. Целью нашей работы было изучение влияния зиксина на сигнальную трансдукцию YAP в ходе эмбрионального развития шпорцевой лягушки *X. laevis*, т.к. эта модельная система предоставляет уникальную возможность исследовать изменения в пространственно-временном контексте при физиологических условиях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе нашего исследования мы сосредоточились на анализе взаимосвязи между фосфорилированной и активной формами YAP в разные моменты развития эмбрионов шпорцевой лягушки *X. laevis* (на стадиях бластулы – стадия 9, гаструлы – стадия 11.5 и нейрулы – стадия 15), используя подходы нокдауна и сверхэкспрессии зиксина. Для генерации эмбрионов с подавленной экспрессией гена *zuxin* мы проводили микроинъекции морфолиновых антисмысловых олигонуклеотидов (МО) в концентрации 0.3 мМ в оба бластомера на стадии двух клеток.

Инъецированные эмбрионы оставляли развиваться и собирали для последующих исследований на стадиях поздней бластулы (стадия 9), средней

гаструлы (стадия 11.5) и средней нейрулы (стадия 15). Поскольку характер морфогенетических движений, в которых участвуют клетки на этих стадиях развития, существенно различается, логично предположить, что зиксин, тесно вовлеченный в регуляцию этих движений, может на разных стадиях развития по-разному влиять на ядерно-цитоплазматическое распределение YAP в клетках. Так, на стадии поздней бластулы, когда в эмбрионе устанавливаются градиенты белков-морфогенов, детерминирующие дифференцировку вдоль будущих осей тела, клетки начинают формировать сложные пространственные паттерны механических напряжений [23, 24]. На стадии гаструляции начинается движение клеток, обеспечивающее сокращение периметра краевой зоны бластопора, одновременно происходит инвагинация клеток мезодермы, а также стягивание эктодермы к вегетативному полюсу. Все эти процессы требуют гибкости и адаптивности клеточных форм и механических свойств тканей [25, 26]. На стадии нейрулы происходит конвергенция клеток эктодермы и мезодермы к дорсальной серединной линии эмбриона, начинается постепенное скручивание нервной пластиинки в нервную трубку [27, 28].

Содержание фосфорилированного (pYAP) и общего YAP анализировали методом вестерн-блоттинга со специфическими антителами к данным белкам. Схема эксперимента показана на рис. 1а. Сравнение уровней pYAP в полученных образцах проводили относительно уровня pYAP в контролльном образце (1-й образец на блоте, рис. 1б) на стадии бластулы (стадия 9), нормируя по уровню общего YAP согласно формуле:

$$Y_1/pY_1 \times pY_n/Y_n$$

где 1 – контрольный образец (стадия 9), а *n* – порядковый номер образца на блоте (рис. 1б), начиная со 2-го.

В результате мы установили, что в контроле уровней pYAP в клетках эмбрионов значимо возрастал между стадиями поздней бластулы и средней гаструлы (рис. 1б, диаграмма). При этом аналогичное снижение уровня нефосфорилированной формы YAP по сравнению с контролем наблюдалось на стадии поздней бластулы в эмбрионах как с нокдауном (МО), так и со сверхэкспрессией зиксина (мРНК зиксина). В то же время на стадии средней гаструлы и ней-

рулы нокдаун *zyxin* уже не вызывал существенных изменений в уровне рYAP и, соответственно, в уровне ядерной, нефосфорилированной формы YAP, по сравнению с контрольными эмбрионами тех же стадий. Наиболее примечательным эффектом, характерным для стадии средней гаструлы, было сильное снижение уровня рYAP в эмбрионах со сверхэкспрессией мРНК зиксина (рис. 1б, диаграмма). Очевидно, что такое снижение рYAP должно означать такое же сильное повышение уровня нефосфорилированной формы YAP в ядрах клеток этих эмбрионов. В отличие от стадий поздней бластулы и средней гаструлы, на стадии средней нейрулы никаких значимых изменений по сравнению с контролем в уровне рYAP в эмбрионах с нокдауном и сверхэкспрессией зиксина выявлено не было (рис. 1б, диаграмма).

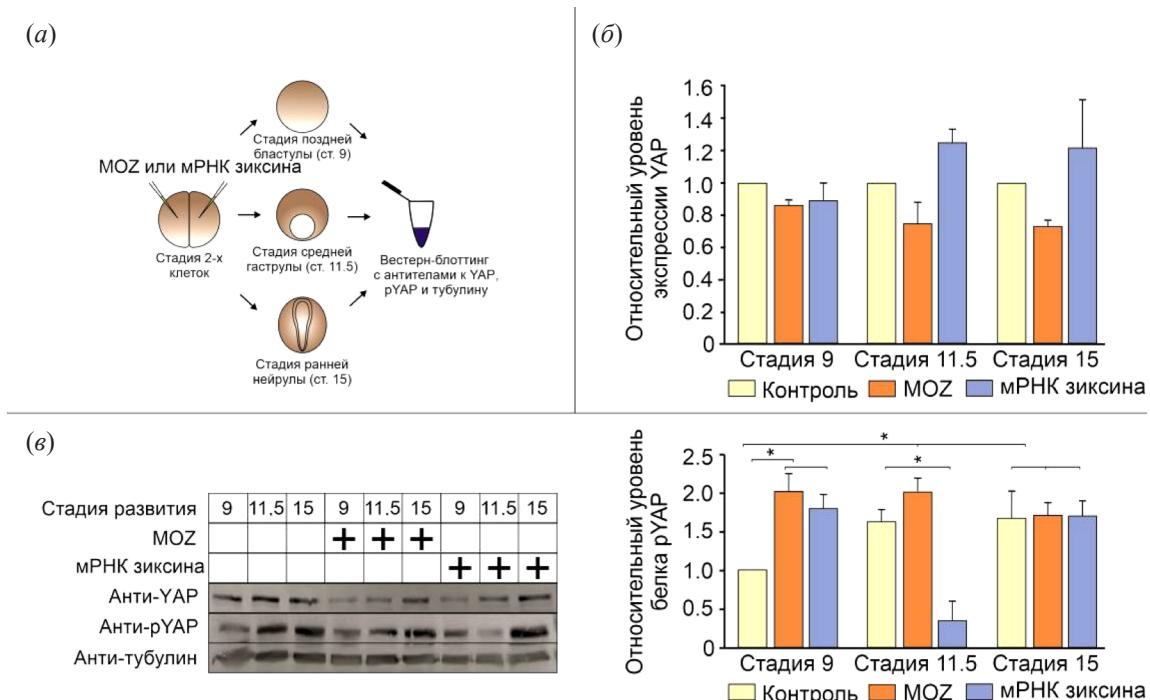
Как следует из блота, представленного на рис. 1в, уровень YAP сильно различается в контрольных и опытных эмбрионах. Чтобы выяснить, связаны ли эти изменения с различиями в уровне экспрессии гена *uar*, мы сравнили количество

его транскриптов с использованием метода количественной ПЦР (qRT-PCR).

Как можно видеть из диаграммы на рис. 1б, существенных изменений в уровне мРНК YAP в опытных образцах по сравнению с контрольными выявлено не было. Эти данные свидетельствуют о том, что колебания в экспрессии зиксина не сказываются на транскрипции YAP. По-видимому, выявленные различия в уровне белка YAP в эмбрионах с измененной концентрацией зиксина связаны с процессом трансляции.

Поскольку наиболее интересные изменения в уровне рYAP методом blotting на лизатах целых эмбрионов были выявлены на стадии средней гаструлы, далее мы сосредоточились на проверке этих изменений другими методами именно на этой стадии развития.

Во-первых, мы проанализировали распределение YAP между ядром и цитоплазмой с помощью иммуногистохимического окрашивания на гистологических срезах контрольных эмбрионов и эмбрионов со сверхэкспрессией зиксина, в которых было обнаружено резкое снижение уровня рYAP, и, соответственно, можно было



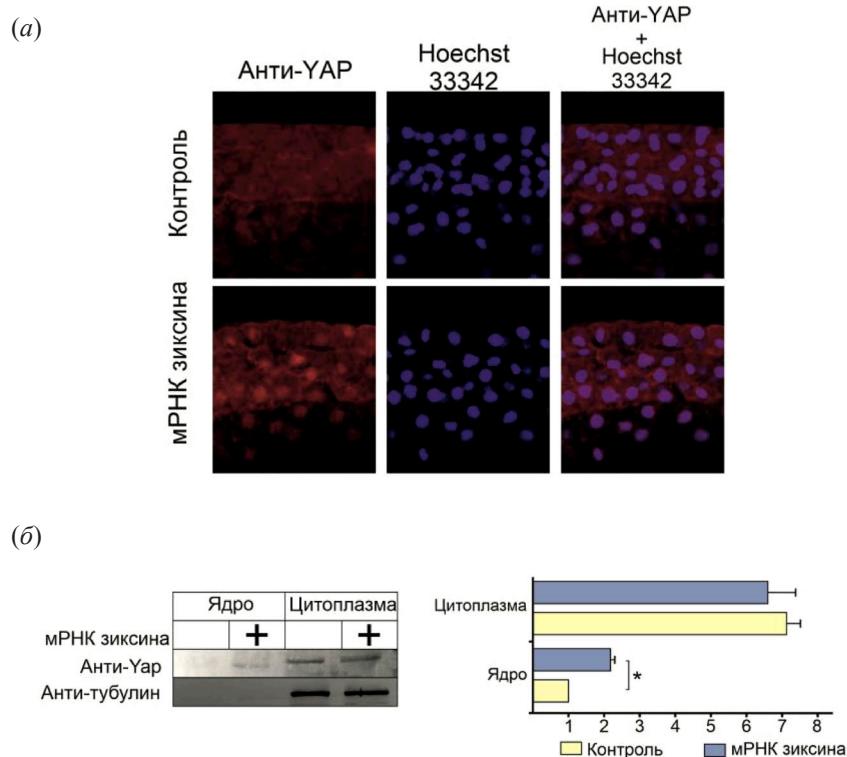
**Рис. 1.** Влияние зиксина на экспрессию YAP. (а) – Схема эксперимента; (б) – анализ количества мРНК YAP методом qRT-PCR; (в) – влияние нокдауна и сверхэкспрессии зиксина на количество белков YAP и рYAP на разных стадиях развития *X. laevis*. Слева – вестерн-блот с детекцией антителами к YAP и рYAP, референсная полоса нагрузки на дорожку – детекция антителами к тубулину. Справа – проверка статистической достоверности изменения уровня рYAP (\*  $p < 0.05$ ).

предполагать повышение уровня нефосфорилированной формы этого белка, которая должна была бы скапливаться в клеточных ядрах. Как можно видеть на рис. 2 $a$ , именно такая картина и была обнаружена: значительно более сильное окрашивание ядер антителами к YAP на срезах эмбрионов, экспрессирующих зиксин, в сравнении с контрольными (рис. 2 $a$ ). На данных фотографиях иммуногистохимическое окрашивание показано в области дорсальной губы бластопора – области эмбриона, где во время гастроуляции происходят наиболее интенсивные морфологические изменения, связанные с процессами инвагинации [29, 30].

Во-вторых, для более детального изучения распределения YAP между ядром и цитоплазмой мы использовали ранее разработанную нами методику [31], которая основана на разделении белкового содержимого этих двух компартментов, с последующим анализом методом вестерн-блоттинга. При этом мы анализировали уровень YAP, а не pYAP, поскольку именно нефосфори-

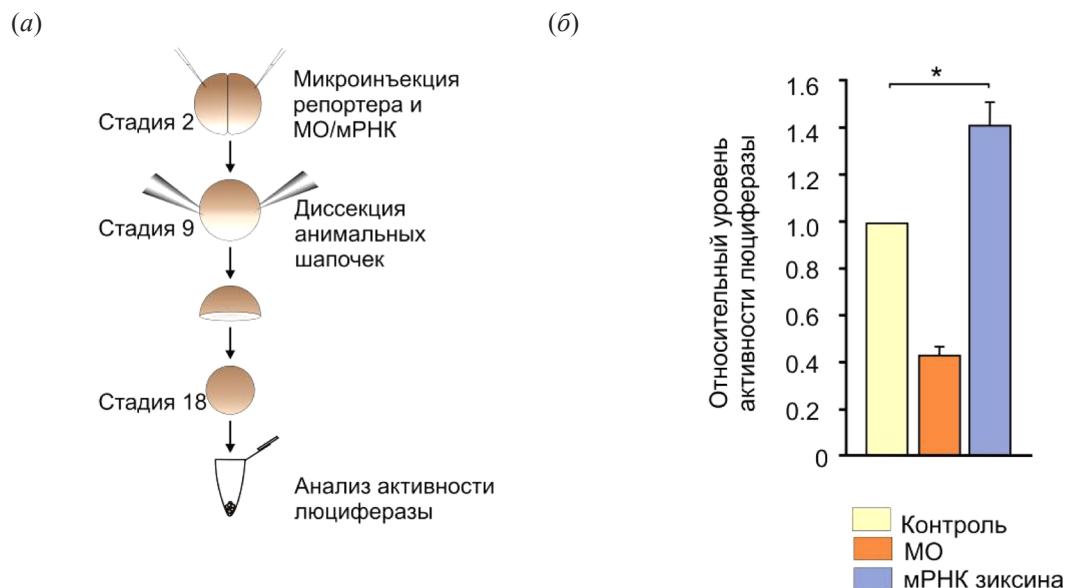
лированный белок транслоцируется в ядро и участвует в регуляции транскрипции [32]. Несмотря на то что общее количество YAP в зародышах со сверхэкспрессией оказалось ниже, их ядерно-цитоплазматическое соотношение было выше в опытных образцах по сравнению с контрольными эмбрионами (рис. 2 $b$ ).

В-третьих, чтобы напрямую сравнить экспрессионную активность YAP в контрольных и опытных эмбрионах на стадии средней гастроулы, мы использовали YAP-специфический люциферазный ДНК-репортер 8xGTIIC-люциферазу. Этот репортер содержит *cis*-регуляторные элементы, чувствительные к YAP, представляющие собой последовательности ACATTCCA, расположенные перед геном люциферазы. Мы инъецировали в амниотическую область каждого бластомера эмбрионов *X. laevis* на стадии двух бластомеров смесь векторов: специфический репортер 8xGTIIC-люциферазу и референс-репортер, в котором экспрессия люциферазы *Renilla* контролируется низкоспецифическим промотором тимидинкиназы. В дополнение к репортерам в часть эмбрионов



**Рис. 2.** Влияние сверхэкспрессии зиксина на активность YAP-сигналинга в эмбрионах *X. laevis* на стадии средней гастроулы (стадия 11.5). (а) – Иммуногистохимический анализ распределения YAP внутри клеток в области дорсальной губы бластопора. Красное окрашивание – антитела к YAP, синее – ядра; (б) – анализ распределения YAP между ядерной и цитоплазматической фракциями методом иммуноблоттинга. В качестве контроля разделения выбраны антитела к тубулину. Проверка статистической достоверности изменения количества YAP, усл. ед. (\*  $p < 0.05$ ).

также совместно инъектировали мРНК зиксина или морфолиновые антисмыловые олигонуклеотиды к мРНК зиксина. На стадии средней бластулы (стадия 8) мы отрезали аниимальные шапочки (АШ) у эмбрионов и инкубировали их в 1× MMR до стадии 18 (рис. 3а). Данная длительная инкубация была необходима для амплификации сигнала. Результаты этого исследования также подтвердили функциональную значимость повышенного уровня YAP в ядре у эмбрионов со сверхэкспрессией зиксина – в таких эмбрионах активность репортера достоверно увеличивалась (рис. 3б).



**Рис. 3.** Влияние сверхэкспрессии и нокдауна зиксина на *цис*-регуляторные элементы, чувствительные к YAP (ACATTCCAC). (а) – Схема эксперимента; (б) – относительный уровень активности репортера 8xGTTC при нокдауне зиксина с помощью морфолиновых нуклеотидов (МО) и сверхэкспрессии путем инъекции мРНК зиксина. Проверка статистической достоверности изменения активности люциферазы, усл. ед. (\*  $p < 0.05$ ).

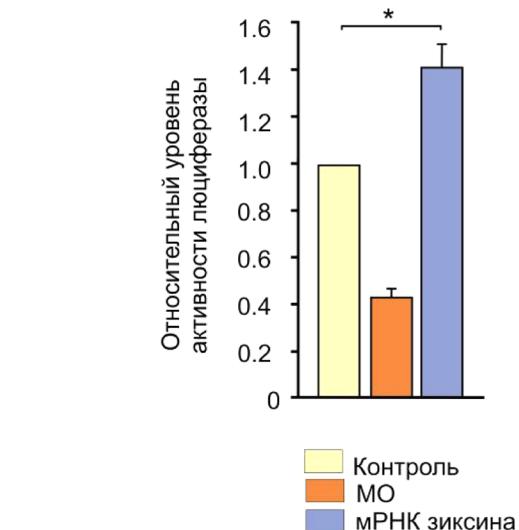
## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Манипуляции с эмбрионами *X. laevis*.** Получение зародышей *X. laevis* и искусственное оплодотворение проводили по методике, разработанной нами ранее [31].

Морфолиновые олигонуклеотиды были направлены против зрелой мРНК зиксина в пределах диапазона от позиции +1 до +25, где стартовый кодон AUG обозначает первые три нуклеотида, что позволяет эффективно ингибиовать синтез белка. Чтобы получить эмбрионы со сверхэкспрессией зиксина, мы проводили микроинъекцию

Таким образом, результаты проведенных экспериментов позволяют сделать вывод о том, что зиксин способствует транслокации YAP в ядро и активирует экспрессию генов-мишеней этого белка. Однако вопрос о том, осуществляется ли данная регуляция через связывание зиксина с Lats2 или же она не зависит от Lats и фосфорилирования YAP, требует дальнейших исследований. Также интересным представляется изучение того, как эти процессы включены в регуляцию других сигнальных путей и формирование морфологических структур в процессе эмбрионального развития.

(б)



100 нг/мкл синтетической мРНК зиксина также на стадии двух бластомеров.

**ПЦР в реальном времени (qRT-PCR).** Выделение и очистку РНК для количественного ПЦР-анализа проводили с помощью ExtractRNA и CleanRNA Standard (Евроген, Россия) по инструкции производителя. Синтезировали кДНК с использованием набора MMLV RT Kit (Евроген, Россия). Для проведения ПЦР использовали готовую реакционную смесь qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия).

Праймеры, использованные в работе: *odc1* (F: 5'-GCCAGTTCTAACAAAGAAACCCA-3',

R: 5'-TCTACGATACGATCCAGCCCCA-3') и *yap1* (F: 5'- CGATCCATTCTCAACAGT-3', R: 5'-GCTTCACCTGTGTCCATTTC-3'). Праймеры синтезировали в ЕвроГен (Россия). Температура отжига праймеров 59°C.

**Транскрипция *in vitro*.** Для синтеза мРНК зиксина использовали набор mMessage mMachine (Ambion, Германия) по методике производителя. Матрицей служил вектор 35T-Zyxin [33], линеаризованный по сайту Vsp1.

**Разделение ядерной и цитоплазматической фракций.** Для разделения лизата на ядерную и цитоплазматическую фракции были использованы зародыши на стадии гаструллы, следуя ранее опубликованной методике [33] с небольшими модификациями, примененными в исследовании [34].

**Гель-электрофорез и иммуноблоттинг.** Образцы исследовали с применением SDS-PAGE в 10%-ном геле по методике Лэммли, после чего их подвергали электротрансферу на PVDF-мембране (Millipore Corp. Inc., США). В качестве первичных антител использовали Phospho-YAP (Ser127) (D9W2I) Rabbit mAb #13008 (Cell Signaling Technology, США) или YAP Antibody #4912 (Cell Signaling Technology), а для контроля нагрузки применяли моноклональные антитела к α-тубулину (Sigma, США). В качестве вторичных антител использовали козы Fab-фрагменты, полученные из антикроличьих антител, конъюгированные с щелочной фосфатазой (Sigma), и Fab-фрагменты антимышьиных антител, также конъюгированные с щелочной фосфатазой (Sigma). Для визуализации результатов применяли стабилизированный субстрат для щелочной фосфатазы Western Blue (Promega, США). После проявки результатирующие изменения в интенсивности полос оценивали с использованием программы ImageJ (<https://imagej.net/ij/>, NIH, США).

**Анализ данных с люциферазного репортера.** Активность двойной люциферазы анализировали с помощью системы анализа Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, США) согласно инструкции производителя.

**Иммуногистохимическое окрашивание.** Образцы тканей фиксировали в растворе (3.7%-ный параформальдегид, 100 мМ МОПС,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2.7 мМ KCl, 0.1% Tween-20) с добавлением 20% сыворотки для блокировки неспецифических связываний (Sigma, США),

после чего инкубировали в течение ночи с первичными антителами Anti-YAP1 [2F12] (Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 100. Затем, после промывок, образцы инкубировали со вторичными антителами из набора Alexa Fluor™ 594 Tyramide SuperBoost™ Kit (Thermo Fisher Scientific, США) по инструкции производителя. Далее образцы помещали в глицерин.

Визуализацию осуществляли на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 700 (Carl Zeiss AG, Германия), объектив 20×. Обработку и анализ изображений проводили с помощью программы Fiji (<https://fiji.sc/>).

**Статистический анализ.** Эксперименты проводили не менее трех раз. Достоверность полученных результатов оценивали с использованием критерия Стьюдента, различия считали статистически значимыми при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы сосредоточились на изучении влияния регулятора актинового цитоскелета – белка зиксина – на транслокацию в ядро эффектора Hippo-сигнального пути – транскрипционного регулятора YAP. Полученные данные свидетельствуют о том, что изменение уровня экспрессии зиксина влияет на динамику фосфорилирования YAP и, как следствие, на распределение YAP между цитоплазмой и ядром, что, в свою очередь, отражается на уровне экспрессии генетических мишней этого белка. Перспективы дальнейших исследований предполагают углубленное изучение механизмов, через которые зиксин взаимодействует с другими регуляторами сигнала, включая Lats2 и другие протеинкиназы, а также их влияние на специфические аспекты клеточной дифференцировки и морфогенеза. Мы запланировали ряд экспериментов, направленных на исследование взаимодействий зиксина с другими белками клеточного цитоскелета и их роль в регуляции механобиологии клетки. В конечном счете данные исследования могут привести к новому пониманию связи между механикой клетки и генетической регуляцией.

В то же время результаты нашей работы в перспективе могут иметь значение и для биомедицины, особенно в контексте разработки терапии для лечения заболеваний, связанных с

нарушениями регуляции клеточной пролиферации, таких как рак. Поскольку сбой в сигнальных путях, включая путь YAP, играет ключевую роль в канцерогенезе, наше понимание этих механических взаимодействий может способствовать созданию более эффективных терапевтических стратегий, направленных на восстановление нормальной функции клеток.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН.

### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-74-01027).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей в качестве объектов исследования. Информированное согласие не требовалось.

Все действующие международные, национальные и институциональные принципы обращения с животными и их использованием были строго соблюдены.

Эксперименты на животных получили одобрение комиссии Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (протокол-заявка № 249 от 9 сентября 2024 г.).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ВКЛАД АВТОРОВ

ЕАП – создание генно-инженерных конструкций, микроИнъекции в эмбрионы, ПЦР в реальном времени, эксперименты с люциферазными репортерами; ЕЕО и ЕЕВ – подготовка образцов, иммуногистохимия; НЮМ – электрофорез и иммуноблоттинг; АГЗ – работа с базами данных, корректировка текста статьи.

### ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Suchyna T., Sachs F. // J. Physiol. Lond. 2007. V. 581. P. 369–387.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.125021>
2. Matheson L.A., Maksym G.N., Santerre J.P., Labow R.S. // J. Biomed. Mater. Res. A. 2006. V. 76. P. 52–62.  
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.30448>
3. Huang C. // Clin. Exp. Hypertens. 2014. V. 2. P. 1009.
4. Delmas P. // Cell. 2004. V. 118. P. 145–148.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.007>
5. Hirata H., Tatsumi H., Sokabe M. // J. Cell Sci. 2008. V. 121. P. 2795–2804.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.030320>
6. Wang Y., Gilmore T.D. // Biochim. Biophys. Acta. 2003. V. 1593. P. 115–120.  
[https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(02\)00349-x](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(02)00349-x)
7. Yoshigi M., Hoffman L.M., Jensen C.C., Yost H.J., Beckerle M.C. // J. Cell Biol. 2005. V. 171. P. 209–215.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.200505018>
8. Ngu H., Feng Y., Lu L., Oswald S.J., Longmore G.D., Yin F.C. // Ann. Biomed. Eng. 2010. V. 38. P. 208–222.  
<https://doi.org/10.1007/s10439-009-9826-7>
9. Janmey P.A., Fletcher D.A., Reinhart-King C.A. // Physiol. Rev. 2020. V. 100. P. 695–724.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2019>
10. Piccolo S., Dupont S., Cordenonsi M. // Physiol. Rev. 2014. V. 94. P. 1287–1312.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2014>
11. Janmey P.A., Wells R.G., Assoian R.K., McCulloch C.A. // Differentiation. 2013. V. 86. P. 112–120.  
<https://doi.org/10.1016/j.diff.2013.07.004>
12. Mohri Z., Del Rio Hernandez A., Krams R. // J. Thorac. Dis. 2017. V. 9. P. E507–E509.  
<https://doi.org/10.21037/jtd.2017.03.179>
13. Basu S., Totty N.F., Irwin M.S., Sudol M., Downward J. // Mol. Cell. 2003. V. 11. P. 11–23.  
[https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00776-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00776-1)
14. Dupont S., Morsut L., Aragona M., Enzo E., Giulitti S., Cordenonsi M., Zanconato F., Le Digabel J., Forcato M., Bicciato S., Elvassore N., Piccolo S. // Nature. 2011. V. 474. P. 179–183.  
<https://doi.org/10.1038/nature10137>
15. Yu F.X., Zhao B., Panupinthu N., Jewell J.L., Lian I., Wang L.H., Zhao J., Yuan H., Tumaneng K., Li H., Fu X.D., Mills G.B., Guan K.L. // Cell. 2012. V. 150. P. 780–791.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.02.007>
16. Ma B., Cheng H., Gao R., Mu C., Chen L., Wu S., Chen Q., Zhu Y. // Nat. Commun. 2016. V. 7. P. 11123.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms11123>
17. 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>

18. *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>
19. *Aragona M., Panciera T., Manfrin A., Giulitti S., Michelin F., Elvassore N., Dupont S., Piccolo S.* // *Cell.* 2013. V. 154. P. 1047–1059.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.042>
20. *Wen S.M., Wen W.C., Chao P.G.* // *Acta Biomater.* 2022. V. 152. P. 313–320.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.08.079>
21. *Zhang S., Chong L.H., Woon J.Y.X., Chua T.X., Cherubba E., Yip A.K., Li H.Y., Chiam K.H., Koh C.G.* // *Commun. Biol.* 2023. V. 6. P. 62.  
<https://doi.org/10.1038/s42003-023-04421-0>
22. *Parshina E.A., Eroshkin F.M., Orlov E.E., Goyeva F.K., Shokhina A.G., Staroverov D.B., Belousov V.V., Zhigalova N.A., Prokhortchouk E.B., Zaraisky A.G., Martynova N.Y.* // *Cell Rep.* 2020. V. 33. P. 108396.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108396>
23. *Harland R., Gerhart J.* // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1997. V. 13. P. 611–667.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.611>
24. *Nelson C.M.* // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2022. V. 24. P. 307–322.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-060418-052527>
25. *Concha M.L., Adams R.J.* // *Development.* 1998. V. 125. P. 983–994.  
<https://doi.org/10.1242/dev.125.6.983>
26. *Huang Y., Winklbauer R.* // *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2018. V. 7. P. e325.  
<https://doi.org/10.1002/wdev.325>
27. *Moon L.D., Xiong F.* // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2022. V. 130. P. 56–69.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcdcb.2021.09.009>
28. *Inoue Y., Suzuki M., Watanabe T., Yasue N., Tateo I., Adachi T., Ueno N.* // *Biomech. Model. Mechanobiol.* 2016. V. 15. P. 1733–1746.  
<https://doi.org/10.1007/s10237-016-0794-1>
29. *Scobeyeva V.A.* // *Int. J. Dev. Biol.* 2006. V. 50. P. 315–322.  
<https://doi.org/10.1387/ijdb.052062vs>
30. *Feroze R., Shawky J.H., von Dassow M., Davidson L.A.* // *Dev. Biol.* 2015. V. 398. P. 57–67.  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.11.011>
31. *Martynova N.Y., Parshina E.A., Zaraisky A.G.* // *STAR Protoc.* 2021. V. 2. P. 100552.  
<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100552>
32. *Cheng Y., Mao M., Lu Y.* // *Biomark. Res.* 2022. V. 10. P. 34.  
<https://doi.org/10.1186/s40364-022-00365-5>
33. *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>
34. *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>

# Cytoskeletal Regulator Zyxin Stimulates Translocations of YAP into *Xenopus laevis* Embryo Cell Nuclei

E. A. Parshina<sup>\*, #</sup>, E. E. Orlov<sup>\*</sup>, E. E. Voronezhskaya<sup>\*\*</sup>,  
N. Yu. Martynova<sup>\*</sup>, and A. G. Zaraisky<sup>\*, \*\*, \*\*\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (919) 767-36-56; e-mail: lena\_parshina5@mail.ru

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

<sup>\*\*</sup>Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences,  
ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

<sup>\*\*\*</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia

There is limited data in the scientific literature regarding the relationship between mechanotransduction associated with changes in Zyxin levels and biochemical signaling of the transcription factor YAP. Research in this area suggests that stress-induced reorganization of the actin cytoskeleton mediated by Zyxin may play a key role in YAP's mechanotransduction. However, the results of these studies do not provide clear outcomes concerning the effect of Zyxin on YAP distribution between the nucleus and the cytoplasm and its activity regulation. Here, we investigated the effects of Zyxin on the nuclear translocation of the Hippo-signaling pathway effector, YAP, in the early embryo of the clawed frog *Xenopus laevis*. Analysis of the nuclear-cytoplasmic distribution of YAP by immunoblotting and immunohistochemical staining, combined with the suppression of translation of endogenous Zyxin mRNA by morpholino antisense oligonucleotides and overexpression of synthetic Zyxin mRNA, revealed a stimulatory effect of Zyxin on the nuclear translocation of YAP in gastrula-stage embryos, but not in blastula and neurula stages. A similar conclusion was reached by analyzing the effect of the same changes in Zyxin concentration on the expression of a YAP-dependent luciferase reporter. Based on the results of our study, and taking into account the known role of Zyxin as one of the mechanotransducers, it can be assumed that this protein is involved in the mechano-dependent regulation of the Hippo signaling pathway in embryonic development at the gastrulation stage.

*Keywords:* morphogenesis, Zyxin, Yap, mechanotransduction, *Xenopus laevis*