



УДК 577.218

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ УРОВНЯ ЦИТОСКЕЛЕТНОГО БЕЛКА ЗИКСИНА НА ПРОЦЕССЫ МЕТАБОЛИЗМА И СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ НА МОДЕЛИ ЭМБРИОНОВ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ

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

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

Поступила в редакцию 14.05.2025 г.

После доработки 25.05.2025 г.

Принята к публикации 26.05.2025 г.

Зиксин – белок цитоскелета, регулирующий сборку и восстановление актиновых филаментов. Исследования, проведенные в нашей лаборатории на модели эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, показали, что зиксин играет важную роль в регуляции экспрессии генов и клеточной дифференцировке. В работах последних лет мы получили интересные данные, указывающие на способность этого механочувствительного белка участвовать в механизмах, связывающих морфогенетические движения с экспрессией генов, ответственных за формирование осевых структур и стволового статуса клеток в самом сложном процессе в жизни любого организма – эмбриогенезе. В этой статье мы представляем последние полученные результаты по поиску генов, сигнальных путей и биологических процессов, которые регулируются с участием зиксина. Для исследования было использовано высокопроизводительное секвенирование пулов мРНК из клеток эмбрионов *X. laevis* на стадии нейрулы с нормальной, повышенной и подавленной при помощи морфолиновых олигонуклеотидов функцией зиксина. Использование биоинформационического анализа позволило выделить из большого числа генов зиксин-зависимые сигнальные пути и биологические процессы, важные для эмбриогенеза. Показано, что подавление зиксина приводит к изменению в экспрессии генов-участников более 16 сигнальных каскадов и влияет на 27 биологических процессов, из которых наиболее выраженные связаны с морфогенезом и генной экспрессией. Результаты работы имеют прежде всего фундаментальное значение. Изучение роли зиксина в передаче сигналов от механических стимулов к аппарату генной экспрессии важно для изучения координации биомеханики и дифференцировки в ходе эмбриогенеза, а в перспективе предоставляет возможность использования зиксина в качестве потенциального диагностического маркера для ряда заболеваний.

Ключевые слова: сигнальные пути, секвенирование, генная онтология, биологические процессы, зиксин

DOI: 10.31857/S0132342325050124

ВВЕДЕНИЕ

Цитоскелетный белок зиксин шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* был первоначально идентифицирован нами в качестве партнера транскрипционного фактора Xanf, одного из ключевых регуляторов развития головного мозга [1, 2]. Впер-

вые были определены полные нуклеотидная и аминокислотная последовательности и паттерн экспрессии гена зиксина в эмбриональном развитии *X. laevis* [1]. Для идентификации других регуляторных белков, способных физически взаимодействовать с зиксином в клетках зародыша

Сокращения: NGS – высокопроизводительное секвенирование нового поколения; ГО – генная онтология; ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; МО – морфолиновые олигонуклеотиды.

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

ного мозга, был проведен их поиск с помощью двухгибридной дрожжевой системы. В результате скрининга с использованием библиотек кДНК из зародышей *X. laevis* были обнаружены последовательности, кодирующие три белка, входящие в состав сигнального каскада *hedgehog* (*Shh*), который регулирует формирование дорсово-вентральной разметки нервной трубки. Функциональный анализ показал, что подавление зиксина при помощи морфолиновых олигонуклеотидов (МО) в клетках эмбрионов приводит к активации *Shh*-каскада. Об этом свидетельствуют данные по анализу изменений паттернов экспрессии его генетических мишени [3–5]. Кроме этого, было выявлено и изучено взаимодействие зиксина с Y-бокс-связывающим транскрипционным фактором *Ybx1*, способным к связыванию и стабилизации мРНК многих генов. Именно это взаимодействие между зиксином и РНК-связывающим белком *Ybx1* обеспечивает регуляцию экспрессии ряда генов стволового статуса клеток [6, 7]. Очевидно, что зиксин способен влиять на уровень экспрессии различных регуляторов и активность внутриклеточных сигнальных путей [8].

Поскольку передача внутриклеточных сигналов регулирует основные биологические процессы, цель настоящей работы заключалась в дальнейшем поиске генов, сигнальных путей и биологических процессов, активность которых зависит от уровня зиксина в клетках зародышей *X. laevis*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для идентификации генов, которые напрямую или косвенно могут регулироваться зиксином, было проведено сравнение транскриптов из клеток с различными уровнями его экспрессии. Для получения образцов для высокопроизводительного секвенирования (NGS) ранее в работе [6] использовали микрохирургически вырезанные зачатки ЦНС (нервные пластиинки вместе с подлежащей мезодермой) из зародышей на стадии нейрулы. В текущем эксперименте использовали целые эмбрионы на стадии нейрулы. Эта стадия была выбрана, поскольку именно в этот период развития происходит спецификация ключевых типов клеточных дифференцировок в зачатке ЦНС.

Были получены образцы тотальной РНК из клеток с искусственно усиленной и подавленной экспрессией зиксина. Для подавления экспрессии в дорсальные бластомеры эмбрионов на стадии начала дробления были микроинъецированы антисмыловые морфолиновые олигонуклеотиды к мРНК зиксина (далее зиксин МО). Для уси- ления его экспрессии были использованы микроинъекции синтетической мРНК зиксина. Ранее нами были отработаны условия таких микроинъекций и показано, что их результатом стало понижение концентрации зиксина в случае инъекций МО или увеличение при инъекциях его мРНК [3]. Одновременно часть эмбрионов была микроинъецирована контрольными МО (эта часть зародышей была контрольной группой). В результате получены три типа эмбрионов: с увеличенным содержанием зиксина, с уменьшенным содержанием зиксина и контрольные (см. схему эксперимента на рис. 1). Главным отличием в подготовке новых образцов для секвенирования было использование целых зародышей из одной кладки

иия его экспрессии были использованы микроинъекции синтетической мРНК зиксина. Ранее нами были отработаны условия таких микроинъекций и показано, что их результатом стало понижение концентрации зиксина в случае инъекций МО или увеличение при инъекциях его мРНК [3]. Одновременно часть эмбрионов была микроинъецирована контрольными МО (эта часть зародышей была контрольной группой). В результате получены три типа эмбрионов: с увеличенным содержанием зиксина, с уменьшенным содержанием зиксина и контрольные (см. схему эксперимента на рис. 1). Главным отличием в подготовке новых образцов для секвенирования было использование целых зародышей из одной кладки

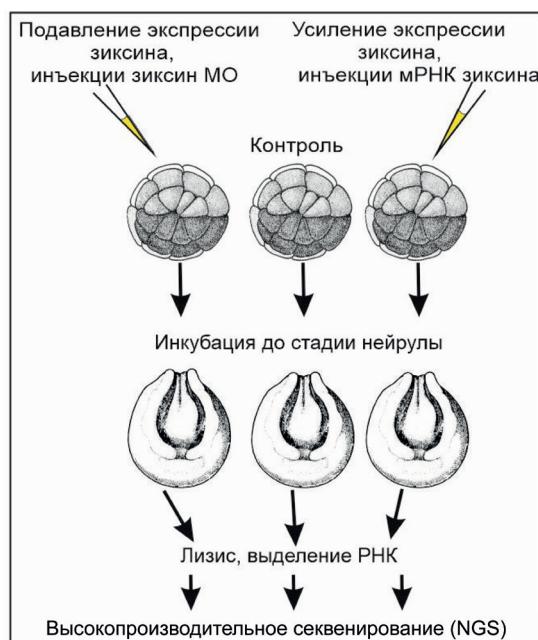


Рис. 1. Схема эксперимента по подготовке образцов для высокопроизводительного секвенирования (NGS) из целых эмбрионов *X. laevis*: 1 этап – микроинъекции в эмбрионы *X. laevis* на стадии 2–4 бластомеров: слева – морфолиновых олигонуклеотидов к мРНК зиксина (зиксин МО) для подавления экспрессии зиксина, справа – синтетической мРНК зиксина для усиления экспрессии зиксина, в центре – контроль (зародыш, инъецированные контрольными МО). Микроинъекции проводили в трех независимых повторностях, используя эмбрионы из разных кладок икры от разных лягушек; 2 этап – инкубация эмбрионов до стадии нейрулы, отбор эмбрионов, лизис и выделение РНК; 3 этап – секвенирование образцов, биоинформационический анализ секвенированных последовательностей, получение списка дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ).

икры для минимизации возможных отклонений, возникших в погрешностях при вырезании нервных пластинок с подлежащей мезодермой в предыдущем эксперименте. Кроме этого, учитывая, что зиксин экспрессируется по всему зародышу (с усилением в дорсальной нейроэктомии) [1], можно найти новые гены, экспрессия которых зависит от уровня зиксина в клетках центральной области зародыша.

При сравнительном анализе транскриптомов из клеток с усиленной экспрессией зиксина было обнаружено только 10 генов с невысокой кратностью изменения. Сильно повышался только уровень мРНК зиксина за счет инъекций кодирующей его синтетической РНК.

В результате анализа списков дифференциально экспрессирующихся генов (далее ДЭГ) из клеток с подавленной и нормальной функцией зиксина было идентифицировано 874 гена, уровень мРНК которых изменялся более чем в 2 раза. При подавлении зиксина содержание транскриптов 543 генов возрастало по сравнению с контролем, а содержание мРНК 331 гена уменьшалось. При оценке достоверности результатов секвенирования мы прежде всего убедились, что содержание транскриптов идентифицированных ранее генов семейства *rou5F3, rxrg, ssx2ip, klf4, vent2.1/2* [6, 7, 9] также сильно возрастало в проведенном эксперименте на целых зародышах, что подтверждает его эффективность.

Далее мы провели анализ влияния подавления зиксина на основные биологические процессы и сигнальные пути с использованием данных ДЭГ, полученных на целых эмбрионах. Биоинформационический анализ проводили на платформе базы данных DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery [10]). Биоинформационические ресурсы DAVID состоят из интегрированной базы биологических знаний и аналитических инструментов, направленных на систематическое извлечение биологического значения из больших списков генов.

Для функциональной аннотации ДЭГ мы использовали систему Gene Ontology (генная онтология, далее по тексту ГО) для вида *X. laevis* по трем основным "словарям" генной онтологии: 1) биологические процессы, 2) молекулярная функция, 3) клеточные компоненты. Кроме этого, был проведен анализ ДЭГ по участию в регуляции сигнальных каскадов и по наличию генов-регуляторов формирования эмбриональных зачатков различных структур.

1) В результате проведенного биоинформационического анализа было показано, что подавление

зиксина больше всего влияет на процессы метаболизма нуклеиновых кислот и регуляцию генной экспрессии. Кроме того, следует отметить значительное количество генов, регулирующих развитие нервной системы, клеточный цикл, апоптоз, межклеточную коммуникацию и формирование дорсовентральной разметки нервной трубы (табл. 1). В табл. 1 приведены число идентифицированных генов, относящихся к определенному процессу в терминах генной онтологии, процентное содержание этих генов и статистические данные, полученные из трех независимых образцов из разных кладок икры от разных лягушек.

2) При анализе молекулярных функций ДЭГ было выявлено 47 генов, кодирующих ДНК-связывающие белки, в основном это транскриptionные регуляторы генной экспрессии. Из них 19 генов были новыми, обнаруженными при секвенировании транскриптомов из клеток целых зародышей, эти гены выделены зеленым цветом в табл. 2. Ранее при анализе ДЭГ из клеток нервных пластинок эти гены не были идентифицированы. Справа приведено Log-изменение количества транскриптов этих генов в случае подавления зиксина.

3) При анализе распределения белковых продуктов ДЭГ по клеточным компонентам наибольшее количество генов кодировало ядерные белки, что дополнительно указывает на то, что зиксин способен влиять на генную экспрессию. Это интересный результат, который подтверждает данные о значительном влиянии состояния цитоскелета на генную экспрессию, поскольку зиксин считается цитоскелетным белком. В табл. 3 приведены число идентифицированных генов, кодирующих белки, относящихся к определенным клеточным компонентам, процентное содержание этих генов и статистические данные, полученные из трех независимых образцов.

Анализ ДЭГ по сигнальным каскадам с использованием Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG) показал, что подавление экспрессии зиксина влияет больше всего на сигналы клеточного цикла, что полностью согласуется с имеющимися в мировой литературе данными [11, 12], а также сигнальные каскады, регулирующие дифференцировку эпидермиса и центральной мезодермы (сигнальные пути Wnt, TGF- β). Конечно, многие сигнальные пути "пересекаются" на разных уровнях в клетке – так, сигнальный путь FoxO участвует в регуляции клеточного цикла, протеостаза, апоптоза, метаболизма и восстановления повреждений ДНК [13–15]. VEGF-

Таблица 1. Распределение ДЭГ из зародышей *X. laevis* по биологическим процессам

Биологические процессы в терминах генной онтологии	Количество генов	%	p-value	Benjamini
Процессы метаболизма нуклеиновых кислот	43	8.9	4,9E-2	6,9E-1
Экспрессия генов	43	8.9	8,4E-2	7,3E-1
Развитие нервной системы	29	6.0	9,3E-2	7,4E-1
Регуляция организации органелл	20	4.1	1,0E-3	8,7E-2
Регуляция клеточного цикла	19	3.9	1,9E-6	3,0E-4
Регуляция апоптоза	16	3.3	5,9E-3	2,4E-1
Репарация ДНК	14	2.9	1,6E-2	4,0E-1
Регуляция межклеточной коммуникации	14	2.9	8,7E-2	7,3E-1
Эндоцитоз	13	2.7	1,3E-2	4,0E-1
Процессинг мРНК	13	2.7	7,8E-2	7,1E-1
Сигнальный путь Wnt	11	2.3	1,7E-2	4,0E-1
Ремоделирование хроматина	10	2.1	2,9E-2	5,5E-1
Морфогенез позвоночных	8	1.6	7,5E-2	7,1E-1
Транспорт мРНК	7	1.4	6,1E-3	2,4E-1
Гастроуляция	7	1.4	8,4E-3	3,0E-1
Регуляция клеточного ответа на стресс	6	1.2	4,6E-2	6,9E-1
Эмбриональное развитие хордовых	6	1.2	8,1E-2	7,1E-1
Модификация РНК	6	1.2	9,5E-2	7,4E-1
Регуляция внутриклеточного транспорта	5	1.0	2,5E-3	1,6E-1
Развитие нервной трубки	5	1.0	2,5E-3	1,6E-1
Регуляция сигнального пути BMP	5	1.0	2,5E-2	5,0E-1
Регуляция организации синапса	4	0.8	6,4E-2	6,9E-1
Регуляция репарации ДНК	4	0.8	6,7E-2	6,9E-1
Формирование дорсовентрального паттерна	4	0.8	6,7E-2	6,9E-1
Предопределение судьбы нейрона	3	0.6	5,4E-2	6,9E-1
Развитие гиппокампа	2	0.4	3,3E-2	5,5E-1
Закладка фоторецепторных клеток	2	0.4	3,3E-2	5,5E-1

Примечание: приведены процентное содержание от общего количества идентифицированных генов (действительно для всех приведенных таблиц) и статистические данные, полученные из данных секвенирования трех независимых образцов из разных кладок икры от разных лягушек.

Таблица 2. Гены, кодирующие ДНК-связывающие белки, идентифицированные при анализе молекулярных функций ДЭГ

Название и обозначение гена	log2 изменения
Histone H2A type 1-like (LOC121402222)	5.7
Forkhead box H1, gene 2 L homeolog (foxh1.2.L)	5.4
Estrogen-related receptor gamma-related L homeolog (esrrgr.L)	5.3
LIM homeobox 5 S homeolog (Ihx5.S)	5.1
Mix paired homeobox S homeolog (mix1.S)	4.2
Nuclear factor 7 S homeolog (xnf7.S)	4.2
PARP1 binding protein L homeolog (parpbp.L)	4.2
POU class 5 homeobox 3, gene 3 L homeolog (pousf3.3.L)	4.2
Eomesodermin L homeolog (eomes.L)	3.7
Leucine rich repeat containing 61 L homeolog (Irrc61.L)	3.5
Retinoid X receptor gamma L homeolog (rxrg.L)	3.5
Pre-B-cell leukemia homeobox 2 L homeolog (pbx2.L)	2.4
GC-rich promoter binding protein 1 L homeolog (gpbp1.L)	2.2
Cone-rod homeobox L homeolog (crx.L)	2.2
Gastrula zinc finger protein XICGF57.1-like (LOC108704624)	2.1
Forkhead box N3 S homeolog (foxn3.S)	1.9
Ataxin 1 S homeolog (atxn1.S)	1.8
General transcription factor Ili S homeolog (gtf2i.S)	1.8
Upstream transcription factor 1 S homeolog (usf1.S)	1.8
Vegt protein S homeolog (vegt.S)	1.8
KLF transcription factor 11 S homeolog (klf11.S)	1.7
Iroquois homeobox 2 L homeolog (irx2.L)	1.6
Nucleic acid binding protein 2 S homeolog (nabp2.S)	1.6
GTF2l repeat domain containing 1 S homeolog (gtf2ird1.S)	1.5
Transcription factor AP-2 alpha L homeolog (tfap2a.L)	1.5
HMG box domain containing 4 S homeolog (hmgxb4.S)	1.4
Grainyhead like transcription factor 3 L homeolog (grh3.L)	1.4
Histone H1C (LOC108717642)	1.4
Regulatory factor X7 L homeolog (rfx7.L)	1.4
Thyrotrophic embryonic factor S homeolog (tef.S)	1.4
ADNP homeobox 2 L homeolog (adnp2.L)	1.3
Hes family bHH transcription factor 4 S homeolog (hes4.S)	1.3
Proliferating cell nuclear antigen L homeolog (pona.L)	1.3
GA binding protein transcription factor subunit alpha L homeolog (gabpa.L)	1.2
GATA binding protein 4 S homeolog (gata4.S)	1.2
TEA domain transcription factor 4 S homeolog (tead4.S)	1.2
GATA binding protein 6 L homeolog (gata6.L)	1.1
SRY-box 3 L homeolog (sox3.L)	1.1
MYCL proto-oncogene, bHLH transcription factor S homeolog (mycl.S)	1
Zic family member 1 S homeolog (zic1.S)	1
Bromodomain adjacent to zinc finger domain 2A L homeolog (bazza.L)	1
Insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 3 L homeolog (igf2bp3.L)	1
Zinc finger protein 652 L homeolog (znf652.L)	-1
Y-box binding protein 1 L homeolog (ybx1.L)	-1.2
Transcription factor CP2-like 1 L homeolog (tcp2/1.L)	-2.6
Transcription factor 4 S homeolog (tcf4.S)	-3
Oocyte zinc finger protein XICOF15-like (LOC108719554)	-4.8

Примечание: зеленым фоном выделены 19 генов, впервые обнаруженных при секвенировании образцов из целых зародышей *X. laevis* (по сравнению с образцами из клеток нервной пластины). Правый столбец показывает log2 изменения уровня транскриптов.

Таблица 3. Распределение белковых продуктов ДЭГ по клеточным компонентам

Клеточные компоненты	Количество генов	%	p-value	Benjamini
Ядро	163	20.9	7,6E-14	3,0E-12
Цитоплазма	103	13.2	4,4E-4	5,7E-3
Эндоплазматический ретикулум	41	5.3	1,6E-6	3,1E-5
Цитоскелет	30	3.9	4,1E-2	4,0E-1
Лизосомы	9	1.2	6,9E-2	4,5E-1
Центромеры	6	0.8	6,5E-2	4,5E-1

путь участвует в процессе формирования новых кровеносных сосудов, в индукции экспрессии генов и стимуляции миграции, пролиферации и выживания клеток [16], а сигналы от ErbB-рецепторов передаются через Akt, MAPK и многие другие пути для регулирования пролиферации клеток, миграции, дифференцировки, апоптоза и подвижности клеток [17]. Полученные данные также подтверждают участие зиксина в дорсово-вентральной разметке зачатка спинного мозга, задаваемой градиентом секрецируемого белка hedgehog [3, 5, 8]. Распределение ДЭГ по сигнальным каскадам представлено в табл. 4. В табл. 5 отображены ДЭГ, активирующиеся в ответ на подавление зиксина, которые идентифицированы как в клетках нервной пластинки в проведенном ранее анализе [6], так и в новом эксперименте с целыми зародышами (активированные гены,

пересекающиеся в двух независимых опытах по секвенированию) и представляют наиболее интересную с точки зрения эмбриогенеза группу генов. Следует отметить, что в эту таблицу попали хорошо изученные нами гены семейства *pou5F3* – *pou5F3.2* и *pou5F3.3*. Механизм регуляции этих генов при участии зиксина и фактора Ybx1 уже был детально охарактеризован нами в работе [6].

Достоверность изменений в экспрессии генов *cerberus1* (*cer1*), *crx*, *zic1* и *foxn3* в настоящий момент подтверждена методом ОТ-ПЦР, продолжаются работы по определению способности зиксина влиять на экспрессию других генов, представленных в табл. 5.

Изучение механизмов влияния зиксина на выявленные гены важно для понимания функционирования этого белка в качестве регулятора дифференцировки и морфогенеза.

Таблица 4. Распределение белковых продуктов ДЭГ по сигнальным каскадам с использованием Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG)

Сигнальный каскад по KEGG	Количество	%	p-value	Benjamini
Клеточный цикл	18	3.7	2,2E-6	3,0E-4
Сигнальный путь FoxO	14	2.9	2,8E-4	1,7E-2
Сигнальный путь Wnt	14	2.9	2,2E-3	5,8E-2
Путь клеточного старения	13	2.7	1,4E-3	4,7E-2
Прогестерон-опосредованное созревание ооцитов	11	2.3	3,8E-4	1,7E-2
Сигнальный путь TGF-β	11	2.3	4,6E-3	1,0E-1
Путь аутофагии у животных	11	2.3	4,9E-2	4,4E-1
Убиквитин-опосредованный протеолиз	9	1.9	5,2E-2	4,4E-1
Сигнальный путь инсулина	9	1.9	5,2E-2	4,4E-1
Спайкосома	9	1.9	5,3E-2	4,4E-1
Сигнальный путь ErbB	7	1.4	3,9E-2	4,4E-1
Сигналинг ответа на бактериальное вторжение	7	1.4	4,2E-2	4,4E-1
Меланогенез	7	1.4	8,4E-2	6,3E-1
Адгезионные контакты	7	1.4	9,7E-2	6,8E-1
Сигнальный путь VEGF	6	1.2	2,1E-2	3,2E-1
Сигнальный путь Hedgehog	5	1.0	7,2E-2	5,7E-1

Таблица 5. Идентифицированные гены-регуляторы формирования эмбриональных зачатков различных структур и регионализации тканей, найденные в списках ДЭГ, общих для секвенирования образцов из целых зародышей и из клеток нервной пластиинки

Эмбриональный морфогенез	Регионализация и формирование паттернов
Phosphatase and actin regulator 4 S homeolog (phacr4.S)	Cone-rod homeobox L homeolog (crx.L)
Dual specificity phosphatase 5 L homeolog (dusp5.L)	TEA domain transcription factor 4 (tead4.S)
Leucine zipper protein 1 S homeolog (luzp1.S)	Zic family member 1 S homeolog (zic1.S)
POU class 5 homeobox 3, gene 3 L homeolog (pou5f3.3.L)	Oral-facial-digital syndrome 1 L homeolog (ofd1.L)
POU class 5 homeobox 3, gene 2 L homeolog (pou5f3.2.L)	Iroquois homeobox 2 L homeolog (irx2.L)
Eomesodermin L homeolog (comes.L)	Homeobox C6 L homeolog (hoxc6.L)
Microfibril associated protein 2 L homeolog (mfap2.L)	POU class 5 homeobox 3, gene 3 L homeolog (pou5f3.3.L)
Forkhead box H1, gene 2 L homeolog (foxh1.2.L)	Chordin, gene 2 L homeolog (chrd.2.L)
Cerberus 1, DAN family BMP antagonist S homeolog (cer1.S)	POU class 5 homeobox 3, gene 2 L homeolog (pou5f3.2.L)
Y -box binding protein 1 L homeolog (ybx1.L)	Cerberus 1, DAN family BMP antagonist S homeolog (cer1.S)
SRY-box 3 L homeolog (sox3.L)	Forkhead box H1, gene 2 L homeolog (foxh1.2.L)

Примечание: зеленым фоном выделены гены, охарактеризованные ранее в работе [6], желтым – гены, общие для двух функциональных направлений (морфогенез и регионализация) генной онтологии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Микроинъекции морфолиновых олигонуклеотидов и мРНК в зародыши *X. laevis*. Для блокирования трансляции мРНК зиксина производили микроинъекции соответствующих морфолиновых нуклеотидов (МО) в концентрации 150 нг/мкл или синтетических мРНК в концентрации 100 нг/мкл в зародыши *X. laevis* на стадии двух бластомеров, как описано ранее [3]. Последовательность морфолиновых нуклеотидов (МО), использованная в работе: зиксин МО – TGAAATGTTGATGGTGAAGGAGGAC. Контрольные МО – TtAAcTGTTaATGtTGA-AtGAGaAC (строчными буквами указаны замены в нуклеотидах).

Анализ данных высокопроизводительного секвенирования. Исходные чтения (прочитанные нуклеотидные последовательности) картировали на геном *X. laevis* v.10.1 в программе STAR версии 2.7.9a (<https://github.com/alexdobin/STAR/>)

releases). Далее также в программе STAR подсчитывали количество последовательностей, откартированных на отдельные гены (использовали аннотацию RefSeq, версия 101) не более чем с тремя несоответствиями. Дифференциальную экспрессию рассчитывали с помощью пакета Deseq2 версии 1.28.1 (<https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>) для языка программирования R.

ПЦР в реальном времени. Для проведения ПЦР использовали готовую реакционную смесь qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. В общий объем смеси 25 мкл входили 5× реакционная смесь qPCRmix-HS SYBR (5 мкл), праймеры 0.2 мКМ, ДНК-матрица 10 нг. Реакцию проводили по методике [9], последовательности праймеров для вновь идентифицированных генов приведены в табл. 6.

Таблица 6. Праймеры для ПЦР в реальном времени, использованные в работе

Название гена	Последовательности праймеров (5'-3')	Длина фрагмента, нт
<i>zic1</i>	Прямой: CCTGCAGGCTTGGTAAGAGA-3 Обратный: GCCCGATGAGACATGCAGAT	151
<i>crx</i>	Прямой: GGAATGGACCTCTGCACTCA Обратный: TTTAGAGCCACCTCCTCCCT	161
<i>cer1</i>	Прямой: CAAAACCTTGCCCTTCACCTCA Обратный: TACAATTAGCGTCAGGTGG	182
<i>foxn3</i>	Прямой: GGAATCTTCCCAGGTGTCCG Обратный: AGATTTGGCGCTGCTGTAGT	174

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате высокопроизводительного секвенирования и сравнения транскриптомов из клеток целых зародышей *X. laevis* с нормальной и подавленной функцией зиксина были определены гены, экспрессия которых зависит от уровня этого белка.

После проведения биоинформационического анализа с использованием базы данных DAVID идентифицированные гены анализировали на принадлежность к сигнальным каскадам, которые участвуют в раннем формировании осевых структур зародыша, и определяли основные биологические процессы (по “словарям” ГО), реагирующие на изменения уровня зиксина.

Результаты такого широкомасштабного поиска генов с применением NGS существенно расширяют и подтверждают полученные ранее данные о способности зиксина регулировать раннее развитие мозга, контролируемое гомеодоменным белком Xanf [1], развитие переднеголовных структур за счет влияния на гены *crx* и *cer* (*cerberus*), которые кодируют важные факторы головного организатора эмбриона; дорсовентральную разметку зародыша спинного мозга, задаваемую градиентом секреции белка *hedgehog* [3]; антериопостериорную разметку зародыша за счет влияния на каскады ретиноевой кислоты [7]; координацию перехода от стволового к дифференцированному статусу клеток в ходе гаструляции путем изменения стабильности мРНК генов-маркеров стволового статуса [6].

Таким образом, результаты, полученные при изучении зиксина из шпорцевой лягушки, открывают широкие перспективы для дальнейшего изучения влияния цитоскелетных механочувствительных белков на экспрессию генов-регуляторов эмбриогенеза, которые могут быть востребованы в исследованиях механизмов закладки и развития центральной нервной системы у позвоночных.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-74-30005 (<https://rscf.ru/project/23-74-30005/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и исполь-

зования животных были соблюдены. Эксперименты на животных одобрены комиссией ИБХ РАН по контролю и использованию лабораторных животных (протокол заявка № 249 от 9 сентября 2024 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – НЮМ, АГЗ; экспериментальные работы – ЕАП, НЮМ; 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. *Martynova N.Y., Eroshkin F.M., Ermolina L.V., Ermakova G.V., Korotaeva A.L., Smurova K.M., Gyoeva F.K., Zaraisky A.G.* // *Dev. Dyn.* 2008. V. 237. P. 736–749.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21471>
2. *Martynova N.Y., Ermolina L.V., Eroshkin F.M., Gyoeva F.K., Zaraisky A.G.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2008. V. 34. P. 513–516.
<https://doi.org/10.1134/S1068162008040183>
3. *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>
4. *Martynova N.Y., Ermolina L.V., Eroshkin F.M., Zaraisky A.G.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2015. V. 41. P. 1–5.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27125030>
5. *Martynova N.Y., Parshina E.A., Eroshkin F.M., Zaraisky A.G.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 530–536.
<https://doi.org/10.31857/S013234232004020X>
6. *Parshina E.A., Eroshkin F.M., Orlov E.E., Gyoeva F.K., Shokhina A.G., Staroverov D.B., Belousov V.V., Zhigalova N.A., Prokhortchouk E.B., Zaraisky A.G., Martynova N.Y.* // *Cell Rep.* 2020. V. 33. P. 108396.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108396>

7. *Parshina E.A., Orlov E.E., Zaraisky A.G., Martynova N.Y.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 5627. <https://doi.org/10.3390/ijms23105627>
8. *Martynova N.Y., Parshina E.A., Zaraisky A.G.* // *FEBS J.* 2021. V. 290. P. 66–72. <https://doi.org/10.1111/febs.16308>
9. *Parshina E.A., Zaraisky A.G., Martynova N.Y.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2024. V. 50. P. 338–344. <https://doi.org/10.31857/S0132342324030133>
10. *Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A.* // *Nat. Protoc.* 2009. V. 4. P. 44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
11. *Hirota T., Morisaki T., Nishiyama Y., Marumoto T., Tada K., Hara T., Masuko N., Inagaki M., Hatakeyama K., Saya H.* // *J. Cell Biol.* 2000. V. 149. P. 1073–1086. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.5.1073>
12. *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>
13. *Brunet A., Bonni A., Zigmond M.J., Lin M.Z., Juo P., Hu L.S., Anderson M.J., Arden K.C., Blenis J., Greenberg M.E.* // *Cell.* 1999. V. 96. P. 857–868. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80595-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80595-4)
14. *Dijkers P.F., Medema R.H., Lammers J.W., Koenderman L., Coffer P.J.* // *Curr. Biol.* 2000. V. 10. P. 1201–1204. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00728-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00728-4)
15. *Lee S.S., Kennedy S., Tolonen A.C., Ruvkun G.* // *Science.* 2003. V. 300. P. 644–647. <https://doi.org/10.1126/science.1083614>
16. *Lee J.W., Hur J., Kwon Y.W., Chae C.W., Choi J.I., Hwang I., Yun J.Y., Kang J.A., Choi Y.E., Kim Y.H., Lee S.E., Lee C., Jo D.H., Seok H., Cho B.S., Baek S.H., Kim H.S.* // *J. Hematol. Oncol.* 2021. V. 14. P. 148. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01147-6>
17. *Liang X., Ding Y., Zhang Y., Chai Y.H., He J., Chiu S.M., Gao F., Tse H.F., Lian Q.* // *Cell Death Dis.* 2015. V. 6. P. e1765. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.91>

Transcriptome Analysis of Zyxin Cytoskeletal Protein Levels Influence on Metabolism and Signaling Pathways in a Model of *Xenopus laevis* Embryos

E. A. Parshina*, 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*

Zyxin is a cytoskeletal protein that plays a crucial role in the assembly and restoration of actin filaments. Research conducted in our laboratory utilizing a model of *Xenopus laevis* embryos has demonstrated that Zyxin is significantly involved in gene expression regulation and the process of cell differentiation. In recent years, we have acquired compelling data that suggest the capacity of this mechanosensitive protein to participate in mechanisms that link morphogenetic movements to the expression of genes responsible for the formation of axial structures and the maintenance of stem cell status during the intricate process of embryogenesis, which is pivotal in the life cycle of any organism. In this article, we present the latest findings from our investigation into the genes, signaling pathways, and biological processes that are regulated in conjunction with the activity of Zyxin. To conduct this study, high-throughput sequencing of mRNA pools from *X. laevis* embryonic cells at the neurula stage was performed. This analysis included samples exhibiting normal Zyxin function, as well as those with increased or suppressed Zyxin function, induced by morpholino oligonucleotides. The application of bioinformatics analysis enabled us to identify Zyxin-dependent signaling pathways and biological processes that are essential for embryogenesis from a comprehensive dataset of genes. Our results indicate that the suppression of Zyxin expression leads to alterations in the expression profiles of genes involved in more than 16 distinct signaling cascades and impacts 27 biological processes. Notably, the most pronounced effects were observed in processes associated with morphogenesis and gene expression. The findings of this study hold significant fundamental implications. Investigating Zyxin role in transducing mechanical stimuli to the gene expression machinery is vital for understanding the coordination between biomechanics and differentiation during embryogenesis. Furthermore, this research may pave the way for utilizing Zyxin as a potential diagnostic marker for various diseases.

Keywords: signaling pathways, sequencing, gene ontology, biological processes, Zyxin