



УДК 577.218

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ МИОЗИНА НА ЭКСПРЕССИЮ МЕХАНОЗАВИСИМЫХ ГЕНОВ В РАННЕМ РАЗВИТИИ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ

© 2022 г. П. А. Филенко*, А. А. Чеченина*, А. Г. Зарайский*, Ф. М. Ерошкин* #

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

Поступила в редакцию 13.12.2021 г.

После доработки 16.12.2021 г.

Принята к публикации 24.12.2021 г.

Механические силы, возникающие в развивающихся зародышах, способны распространяться в эмбрионах на значительные расстояния и влиять на экспрессию генов. Изучение механозависимой транскрипции – актуальная задача современной биологии развития. Один из подходов к решению этой задачи – применение низкомолекулярных ингибиторов миозина. В настоящей работе мы изучили методом ОТ-ПЦР влияние четырех ингибиторов миозина – блебистатина, *S*-нитроблебистатина, ML-9 и 2,3-бутандион монооксима – на экспрессию восьми механозависимых генов в ранних зародышах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. При воздействии ингибиторов миозина наблюдалось изменение уровня экспрессии четырех механозависимых генов: *gsc*, *myh6*, *Xbra* и *xmc*. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что механические силы могут играть роль в передне-задней разметке зародыша *X. laevis*, регулируя экспрессию соответствующих генов.

Ключевые слова: эмбриогенез, механические напряжения, механозависимая транскрипция, цитоскелет, *Xenopus laevis*

DOI: 10.31857/S0132342322040091

ВВЕДЕНИЕ

Механические силы играют важную роль в эмбриогенезе, выступая связующим звеном между морфогенезом и клеточной дифференцировкой [1, 2]. В ходе эмбрионального развития они возникают при направленном перемещении клеток внутри зародыша [3–5]. Формируя градиенты, механические напряжения могут служить как своего рода морфогены, влияя на транскрипцию генов. Поиск и изучение механозависимых генов – важные задачи современной биологии развития.

Цель настоящего исследования – подтвердить механозависимый характер регуляции в целых ранних зародышах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* тех генов, которые ранее были идентифицированы как механозависимые на модели эмбриональных эксплантатов *X. laevis*.

Сокращения: БДМ – 2,3-бутандион монооксим; ОТ-ПЦР – обратная транскрипция, сопряженная с полимеразной цепной реакцией; MMR – модифицированный раствор Рингера (Mark's modified Ringer).

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-86-11; эл. почта: xenopus.fe@gmail.com).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами была разработана методика искусственного растяжения фрагментов эмбриональных тканей (эксплантатов) шпорцевой лягушки *X. laevis* и с помощью высокопроизводительного секвенирования проведено сравнение транскриптомов растянутых и контрольных эксплантатов (неопубликованные данные). Было обнаружено, что растяжение повышает экспрессию генов *Xbra*, *cdx4*, *myh6* и *xmc*, которые в норме экспрессируются в задней части зародыша, испытывающей наибольшие механические напряжения, и понижает экспрессию генов *CD82*, *cebpa*, *gsc* и *otx2a*, которые в норме экспрессируются в головной части, где механические напряжения отсутствуют [6]. Известно, что данные гены – ключевые регуляторы развития соответствующих отделов эмбриона [7–9]. Это подтверждает нашу гипотезу о роли градиента механических сил как регулятора передне-задней разметки зародыша [2]. Однако эксперименты на модели эмбриональных эксплантатов позволяют судить о роли механических натяжений в нормальном развитии лишь косвенно. Помочь ответить на этот вопрос могли бы эксперименты типа “loss-of-function”,

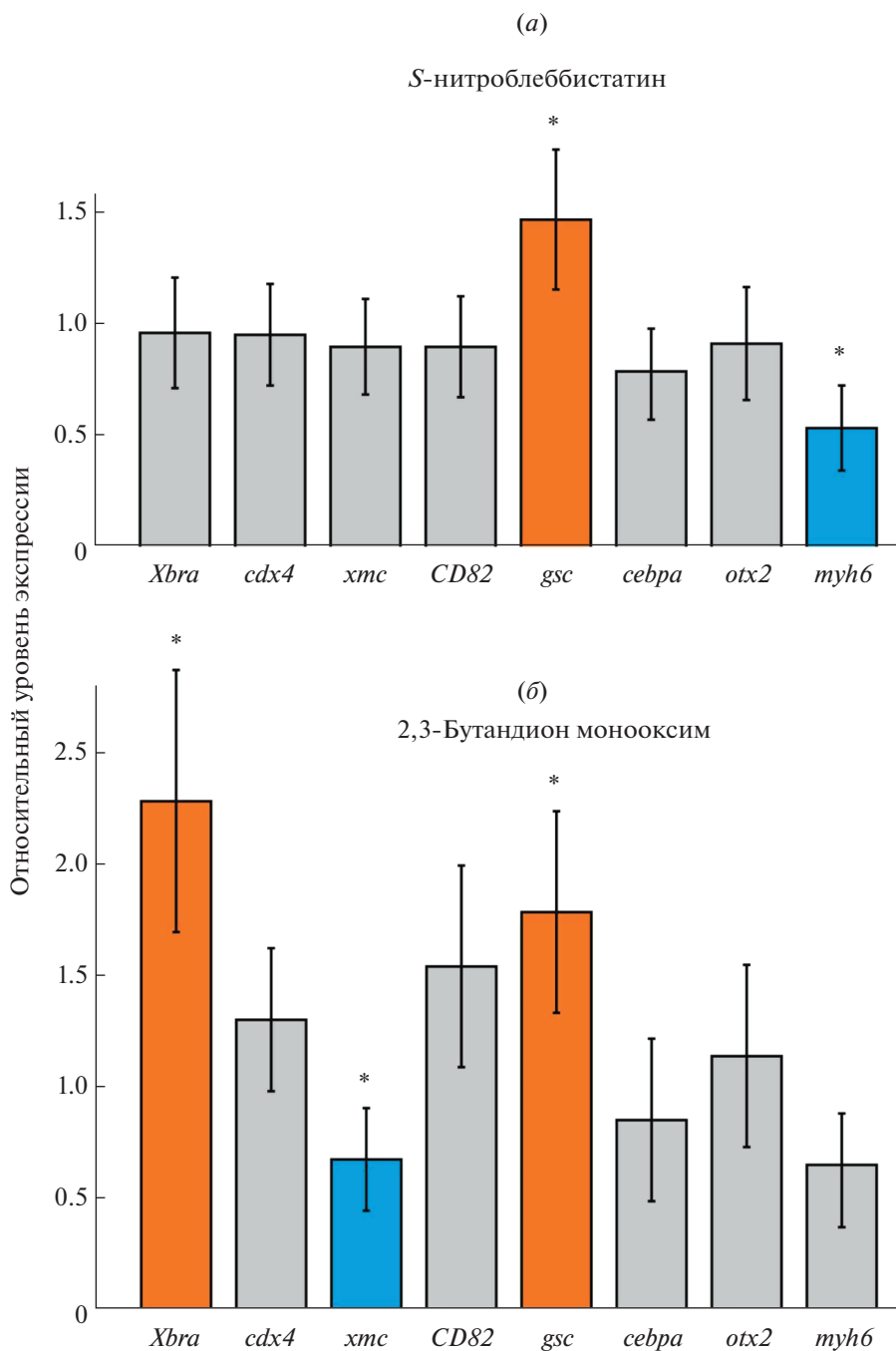


Рис. 1. Влияние *S*-нитроблеббистатина (а) и 2,3-бутандион монооксима (б) на экспрессию изучаемых генов в ранних зародышах шпорцевой лягушки *X. laevis*. Уровень экспрессии в контрольных (необработанных) зародышах принят за единицу. Звездочкой обозначено достоверное изменение уровня экспрессии соответствующих генов ($p > 0.95$). Оранжевые столбцы обозначают активируемые гены, синие — ингибируемые. Планки погрешности отображают стандартное отклонение.

т.е. с ослаблением определенной функции, в нашем случае — механических напряжений.

Поскольку возникновение и распространение механических сил опосредуется перестройкой цитоскелета и актин-миозиновыми сокращениями [10], один из способов сброса механических

напряжений в зародыше — применение низкомолекулярных ингибиторов миозина. При этом логично ожидать, что экспрессия механоактивируемых генов будет падать при уменьшении напряжений в зародыше, а механоингибируемых — возрастать. Данный метод успешно применялся в работах по

Таблица 1. Последовательности праймеров для ОТ-ПЦР в реальном времени

Мишень	Праймер	Последовательность (5'–3')
<i>ODC</i>	ODC D	GCCAGTTCTAACAAGAAACCCA
	ODC R	TCTACGATACGATCCAGCCCA
<i>Xbra</i>	Xbra D	TGCCTAAATAACCACAAACTTCTCC
	Xbra R	ATATAACATACTTTCTCTCCCCGT
<i>cdx4</i>	Cdx4 D	CCCAGTTTGTGGCTGTGTTT
	Cdx4 R	TGGCTGGCTGGTATAAGGAG
<i>myh6</i>	myh6 D	CAAACCCAGTTAGAGGCTGAGA
	myh6 R	GAGCGGTTGGCCTGACTT
<i>xmc</i>	Xmc D	GGATACCCTTTCCCAACTGA
	Xmc R	TGGACAATTCTGCCTCCAGC
<i>CD82</i>	CD82 D	ATCTGCCCTATGTTGGAGGTG
	CD82 R	CTGTTCTGCCCTACTGGTC
<i>cebpa</i>	cebpa D	GATCCTTCCAGTTCGGACCA
	cebpa R	GGTCGGGCCTCTGTGTACTT
<i>gsc</i>	Gsc D	TGGCAAGGAGGGTTCATCT
	Gsc R	ATTCCACTTTTGGGCATTTTCT
<i>otx2a</i>	Otx2a D	ATTTTACCCACACAGAACCCT
	Otx2a R	CTCCATCTTTTATCCACCTGCT

изучению механозависимых генов на зародышах *Danio rerio* [11] и *Nematostella vectensis* [12]. Для обработки зародышей *X. laevis* нами были использованы четыре ингибитора миозина: (–)-блеббистатин, *S*-нитроблеббистатин, ML-9 и 2,3-бутандион монооксид (БДМ). Данные ингибиторы различаются по механизму действия: (–)-блеббистатин и *S*-нитроблеббистатин блокируют активируемую актином АТФазу немускульных миозинов [13]; ML-9 блокирует киназу легкой цепи миозина [14]; БДМ ингибирует АТФазную активность моторных доменов миозина II скелетных мышц [15]. Влияние ингибиторов миозина на экспрессию генов оценивали с помощью количественной ОТ-ПЦР.

Проведенные эксперименты показали, что воздействие (–)-блеббистатином и ML-9 не влияет достоверно на экспрессию изучаемых генов (данные не приведены), что может объясняться особенностями выбранного модельного организма. Воздействие *S*-нитроблеббистатином увеличивает экспрессию *gsc* и уменьшает экспрессию *myh6* (рис. 1а). Воздействие БДМ увеличивает экспрессию *Xbra* и *gsc* и уменьшает экспрессию *xmc* (рис. 1б). Из полученных результатов можно сделать несколько выводов. Во-первых, изменения экспрессии генов *gsc*, *myh6* и *xmc* совпадают с ожидаемыми, что подтверждает их механозависимую природу. Во-вторых, несколько неожиданная активация экспрессии *Xbra* под действием БДМ, возможно, объясняется побочными эффектами БДМ [16]. В-третьих, различия в эффек-

тах разных ингибиторов миозина указывают на различия в механизмах регуляции разных генов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для приготовления растворов блеббистатин (кат. № 203391; Sigma-Aldrich, США), *S*-нитроблеббистатин (кат. № 13891; Cayman Chemical, США) и ML-9 (кат. № C1172; Sigma-Aldrich, США) разводили в DMSO до конечной концентрации 10 мМ. Эмбрионы *X. laevis* инкубировали до стадии ранней гаструлы в растворе 0.1 × MMR (модифицированный раствор Рингера) по стандартной методике [9], затем в среду добавляли ингибиторы миозина в конечной концентрации 50 мкМ ((–)-блеббистатин, *S*-нитроблеббистатин и ML-9) и 25 мМ (БДМ (кат. № 31550; Sigma-Aldrich, США)). Чтобы избежать выпадения в осадок блеббистатина, раствор готовили по методике Swift et al. [17]: в темноте, с использованием предварительно нагретого до 42–43 °С раствора 0.1 × MMR. Раствор БДМ готовили непосредственно перед применением. После добавления ингибиторов эмбрионы инкубировали 6 ч при комнатной температуре в темноте. Затем из них выделяли тотальную РНК с использованием реагента ExtractRNA (кат. № BC032; Евроген, Россия). Изменения в экспрессии генов количественно оценивали при помощи ОТ-ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя SybrGreen по ранее опубликованной методике [18], последовательности праймеров приведены в табл. 1. Каждый эксперимент проводили в 6–12

повторностях, статистическую достоверность результатов оценивали по *t*-критерию Стьюдента ($p > 0.95$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, методом ОТ-ПЦР нами изучено влияние влияния четырех ингибиторов миозина — блеббистатина, *S*-нитроблеббистатина, ML-9 и 2,3-бутандион монооксима — на экспрессию восьми механозависимых генов в ранних зародышах шпорцевой лягушки *X. laevis*. Эти гены ранее были идентифицированы нами как механозависимые на модели эмбриональных эксплантатов *X. laevis*. В настоящей работе показано, что при воздействии ингибиторов миозина изменялся уровень экспрессии четырех генов: *gsc*, *myh6*, *Xbra* и *xmc*. Важно отметить, что головные, механически ингибируемые гены (*CD82* и *gsc*) активируются при фармакологической релаксации, в то время так туловищные, механически активируемые гены (*myh6* и *xmc*), наоборот, подавляются, что логично согласуется с прочими данными и подтверждает механозависимый характер регуляции этих генов в целых ранних зародышах *X. laevis*. Полученные результаты подкрепляют наше предположение о роли механических натяжений в передне-задней разметке зародыша [2].

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-00892).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agarwal P., Zaidel-Bar R. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2021. V. 68. P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.08.007>
2. Eroshkin F.M., Zاراisky A.G. // *Genesis*. 2017. V. 55. P. 4. <https://doi.org/10.1002/dvg.23026>
3. Moore S.W., Keller R.E., Koehl M.A. // *Development*. 1995. V. 121. P. 3131–3140. <https://doi.org/10.1242/dev.121.10.3131>
4. Sullive J., Xiu H., Chen Y., Gou K., Xiong F., Guo M., Chen Z. // *Small*. 2021. P. e2103466. <https://doi.org/10.1002/smll.202103466>
5. Бредов Д.В., Володяев И.В., Лучинская Н.Н. // *Онтогенез*. 2021. Т. 52. С. 317–328. [Bredov D.V., Volodyaev I.V., Luchinskaya N.N. // *Russ. J. Develop. Biol.* 2021. V. 52. P. 277–286.] <https://doi.org/10.31857/S0475145021050025>
6. Eroshkin F.M., Kremnev S.V., Ermakova G.V., Zараиский А.Г. // *Онтогенез*. 2018. Т. 49. С. 361–371. [Eroshkin F.M., Kremnev S.V., Ermakova G.V., Zараisky A.G. // *Russ. J. Develop. Biol.* 2018. V. 49. P. 362–369.] <https://doi.org/10.1134/S1062360418060024>
7. Isaacs H.V., Andreazzoli M., Slack J.M. // *Evol. Dev.* 1999. V. 1. P. 143–152. <https://doi.org/10.1046/j.1525-142x.1999.99020.x>
8. Latinkic B.V., Smith J.C. // *Development*. 1999. V. 126. P. 1769–1779. <https://doi.org/10.1242/dev.126.8.1769>
9. Eroshkin F.M., Байрамов А.В., Ермакова Г.В., Зараиский А.Г., Мартынова Н.Ю. // *Биоорг. химия*. 2018. Т. 44. С. 303–315. [Eroshkin F.M., Bayramov A.V., Ermakova G.V., Zараisky A.G., Martynova N.Y. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2018. V. 44. P. 310–321.] <https://doi.org/10.1134/S1068162018030032>
10. Discher D.E., Janmey P., Wang Y.L. // *Science*. 2005. V. 310(5751). P. 1139–1143. <https://doi.org/10.1126/science.1116995>
11. Brunet T., Bouclet A., Ahmadi P., Mitrossilis D., Driquez D., Brunet A., Henry L., Serman F., Béalle G., Ménager C., Dumas-Bouchiat F., Givord D., Yanicostas C., Le-Roy D., Dempsey N.M., Plessis A., Farge E. // *Nat. Comm.* 2013. V. 4. P. 2821. <https://doi.org/10.1038/ncomms3821>
12. Pukhlyakova E., Aman A.J., Elsayad K., Technau U. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. P. 6231–6236. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713682115>
13. Straight A.F., Cheung A., Limouze J., Chen I., Westwood N.J., Sellers J.R., Mitchison T.J. // *Science*. 2003. V. 299(5613). P. 1743–1747. <https://doi.org/10.1126/science.1081412>
14. Saitoh M., Naka M., Hidaka H. // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1986. V. 140. P. 280–287. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(86\)91087-9](https://doi.org/10.1016/0006-291x(86)91087-9)
15. Higuchi H., Takemori S. // *J. Biochem.* 1989. V. 105. P. 638–643. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122717>
16. Ostap E.M. // *J. Muscle. Res. Cell Motil.* 2002. V. 23. P. 305–308. <https://doi.org/10.1023/a:1022047102064>
17. Swift L.M., Asfour H., Posnack N.G., Arutunyan A., Kay M.W., Sarvazyan N. // *Pflugers Arch.* 2012. V. 464. P. 503–512. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1147-2>
18. Мартынова Н.Ю., Паршина Е.А., Ерошкин Ф.М., Зараиский А.Г. // *Биоорг. химия*. 2020. Т. 46. С. 396–403. [Martynova N.Y., Parshina E.A., Eroshkin F.M., Zараisky A.G. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 530–536.] <https://doi.org/10.31857/S013234232004020X>

The Effect of Myosin Inhibitors on the Expression of Mechano-Dependent Genes in the Early Development of the Clawed Frog

P. A. Filenko*, A. A. Chechenina*, A. G. Zарaisky*, and F. M. Eroshkin*, #

#Phone: +7 (495) 336-86-11; e-mail: xenopus.fe@gmail.com

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

Mechanical forces arising in developing embryos are able to spread over considerable distances in embryos and affect gene expression. The study of mechano-dependent transcription is one of the topical issues of modern developmental biology. One of the approaches to solving this problem is the use of low molecular weight myosin inhibitors. In this paper, we studied by RT-PCR the effect of four myosin inhibitors – blebbistatin, *S*-nitroblebbistatin, ML-9 and 2,3-butanedione monooxime – on the expression of eight mechano-dependent genes in early embryos of the clawed frog. When exposed to myosin inhibitors, we observed a change in the expression level of four mechano-dependent genes, namely *gsc*, *myh6*, *Xbra*, and *xmc*. These results indicate that mechanical forces can play a role in the antero-posterior patterning of the embryo by regulating the expression of the corresponding genes.

Keywords: embryogenesis, mechanical stresses, mechano-dependent transcription, cytoskeleton, *Xenopus laevis*