УДК 577.218 DOI: https://doi.org/10.17816/MAJ631471



НЕЙРОНАЛЬНЫЙ БЕЛОК GAP-43 В РАННИХ ЭМБРИОНАХ МЫШИ

Ф.М. Захарова^{1, 2}, Н.А. Яговкина², В.В. Захаров³

- ¹ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
- ² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

³ Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Для цитирования: Захарова Ф.М., Яговкина Н.А., Захаров В.В. Нейрональный белок GAP-43 в ранних эмбрионах мыши // Медицинский академический журнал. 2024. Т. 24. № 3. С. 78–86. DOI: https://doi.org/10.17816/MAJ631471

Рукопись получена: 01.05.2024

Рукопись одобрена: 29.06.2024

Опубликована online: 27.09.2024

Обоснование. GAP-43 (growth-associated protein 43) — специфический нейрональный белок позвоночных животных, локализованный преимущественно на плазматической мембране аксонных окончаний. GAP-43 играет важную роль в ориентации конусов роста аксонов, в регенеративных процессах в нервной системе и в синаптической пластичности. Недавно нами было показано, что GAP-43 присутствует в ооцитах и зиготах мыши, где он локализован в цитоплазме, что, предположительно, связано с особенностями его экспрессии и модификаций в этих клетках.

Цель — исследование особенностей локализации GAP-43 в клетках ранних (предимплантационных) эмбрионов мыши — от стадии зиготы до стадии бластоцисты.

Материалы и методы. В работе были использованы мыши гибриды F1 C57BL/CBA. Ооциты и зиготы получали с помощью гормональной стимуляции самок. Для иммуноцитохимического окрашивания ооцитов и ранних эмбрионов использовали первичные поликлональные антитела к белку GAP-43 и к его фосфорилированной (по остатку Ser41) форме.

Результаты. С помощью иммуноцитохимического окрашивания было исследовано внутриклеточное распределение белка GAP-43 в ооцитах (на стадии метафазы II) и в ранних эмбрионах мыши — от одноклеточной стадии (зиготы) до стадии бластоцисты. В ооцитах наблюдается равномерное распределение белка по цитоплазме с наибольшей интенсивностью окрашивания в области веретена деления. В ранних эмбрионах GAP-43 присутствует в ядрах и цитоплазме. Соотношение количества GAP-43 в ядре и цитоплазме меняется в зависимости от стадии развития эмбриона и фазы клеточного цикла бластомеров. Характерное для нейронов фосфорилирование GAP-43 по остатку Ser41 также наблюдается в ядрах и цитоплазме клеток ранних эмбрионов. В бластоцистах высокое содержание белка GAP-43 сохраняется только в плюрипотентных клетках внутренней клеточной массы.

Заключение. В настоящей работе мы впервые продемонстрировали присутствие белка GAP-43 в клетках ранних эмбрионов мыши и выявили существенные особенности локализации белка GAP-43 в них — локализацию в цитоплазме и ядре клеток вместо локализации на плазматической мембране, характерной для нейронов. Полученные данные позволяют сделать заключение об особой роли GAP-43 в тоти- и плюрипотентных клетках ранних эмбрионов.

Ключевые слова: ооциты мыши; зиготы мыши; ранний эмбриогенез; GAP-43.

NEURONAL PROTEIN GAP-43 IN EARLY MOUSE EMBRYOS

Faina M. Zakharova^{1, 2}, Nadezhda A. Yagovkina², Vladislav V. Zakharov³

¹ Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia;

³ Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

For citation: Zakharova FM, Yagovkina NA, Zakharov VV. Neuronal protein GAP-43 in early mouse embryos. *Medical Academic Journal*. 2024;24(3):78–86. DOI: https://doi.org/10.17816/MAJ631471

Received: 01.05.2024

Accepted: 29.06.2024

Published online: 27.09.2024

BACKGROUND: GAP-43 (growth-associated protein 43) is a specific neuronal protein of vertebrates, which is predominantly localized at the plasma membrane of axon terminals. GAP-43 plays an important role in axon growth cone guidance, neuroregeneration and synaptic plasticity. We have recently shown that GAP-43 is also present in mouse oocytes and zygotes, where the protein exhibits cytoplasmic localization, which presumably results from peculiar GAP-43 expression and modifications in these cells.

AIM: The aim of the research was to study GAP-43 localization in early (preimplantation) mouse embryos, from zygote to blastocyst stage.

MATERIALS AND METHODS: C57BL/CBA F1 hybrid mice were used in the work. Oocytes and zygotes were obtained by hormonal stimulation of female mice. For immunocytochemical staining of oocytes and early embryos, primary polyclonal antibodies to GAP-43 and Ser41-phosphorylated GAP-43 were used.

RESULTS: The intracellular distribution of GAP-43 protein in mouse oocytes (at the metaphase II stage) and early embryos — from the unicellular stage (zygote) to the blastocyst stage — was studied by immunocytochemical assay. In oocytes, there is a uniform distribution of protein throughout the cytoplasm with the highest intensity of staining in

the meiotic spindle region. In early embryos, GAP-43 is present in the nuclei and cytoplasm. The relative amount of GAP-43 in the nucleus and cytoplasm varies depending on the stage of embryo development and the cell cycle phase of blastomeres. The phosphorylation of GAP-43 at Ser41 residue, which is characteristic of neurons, is also observed in the nuclei and cytoplasm of early embryo cells. At blastocyst stage, the high expression of GAP-43 is preserved only in the pluripotent cells of the inner cell mass.

CONCLUSIONS: For the first time, we have demonstrated the presence of GAP-43 protein in early mouse embryos. The significant difference between GAP-43 localization in neurons (plasma membrane) and early embryo cells (cytoplasm and nucleus) was revealed. The results suggest a specific role of GAP-43 in toti- and pluripotent cells of early embryos.

Keywords: mouse oocytes; mouse zygotes; early embryogenesis; GAP-43.

Обоснование

GAP-43 (growth-associated protein 43) — это специфический нейрональный белок позвоночных животных. В нейронах данный белок локализован преимушественно в примембранной области аксонных окончаний [1-3]. GAP-43 играет важную роль в эмбриональном развитии нервной системы, участвуя в ориентации конусов роста аксонов. Во взрослом организме GAP-43 обеспечивает синаптическую пластичность и регенеративные процессы в нервной системе [4-9]. Было показано, что на молекулярном уровне GAP-43 способен кластеризовать кислые фосфоинозитиды в плазматической мембране с помощью поликатионного эффекторного домена под контролем кальмодулина и протеинкиназы С, что обусловливает его участие в регуляции динамики актинового скелета [10, 11]. Предположительно, функционирование белка GAP-43 связано с образованием крупных олигомерных комплексов в присутствии кислых фосфолипидов [12, 13]. GAP-43 относится к нативно-неупорядоченным белкам, для которых характерно многообразие белок-белковых взаимодействий и полифункциональность [13]. Длительное время полагали, что этот белок нейроспецифический [1, 7]. Однако в настоящее время имеются данные о присутствии белка GAP-43 в клетках глии, в хромафинных клетках [1], в подоцитах [14], в мышечных [15] и раковых [16] клетках. Недавно нами было показано, что GAP-43 присутствует также в ооцитах и зиготах мыши. При этом в ооцитах на стадии метафазы II GAP-43 локализован на тубулиновых структурах — мейотическом веретене и центрах организации микротрубочек — и фосфорилируется протеинкиназой С [17]. Примечательно, что особенности экспрессии, модификации и функции GAP-43 в различных типах клеток значительно отличаются, в то время как взаимодействия данного белка со своими основными внутриклеточными партнерами (протеинкиназой С, кальмодулином, актином и кислыми фосфолипидами) сохраняются [17]. GAP-43 также был обнаружен в пролиферирующих плюрипотентных клетках (клетках эмбриональной карциномы мыши) [18] и мультипотентных клетках (нейрональных предшественниках), где

он локализован в цитоплазме, на центросомах и в области хроматина [19].

Цель — исследование особенностей локализации GAP-43 в клетках ранних (предимплантационных) эмбрионов мыши, обладающих тотии плюрипотентными свойствами.

Материалы и методы

В работе были использованы мыши гибриды F1 C57BL/CBA. Для получения ооцитов и зигот проводили гормональную стимуляцию самок введением 10 МЕ гонадотропина сыворотки жеребой кобылы (Мосагроген, Россия) и 10 МЕ хорионического гонадотропина человека (Intervet International B.V., Нидерланды) с интервалом 42-46 ч. Самок подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации через 13–20 ч после введения хорионического гонадотропина человека, после чего комплекс ооцитов/зигот с кумулюсными клетками извлекали из яйцевода мыши. Культивирование эмбрионов мыши до стадии бластоцисты проводили в CO₂-инкубаторе (5 % CO₂, 37 °C) в среде G-1 Plus (Vitrolife, Швеция).

Иммуноцитохимическое окрашивание ооцитов и ранних эмбрионов проводили по стандартной методике [17]. В работе использовали первичные антитела к GAP-43 AB5312 и AB5401 (Millipore, США), разведение в 200 раз, и вторичные антитела A-11034 с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США), разведение в 500 раз. Хромосомы окрашивали DAPI. Препараты готовили на предметном стекле с использованием заключающей среды Vectashield (Vector Laboratories, США) и анализировали с помощью конфокального микроскопа LSM-510 Meta (Carl Zeiss, Германия) в ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

Результаты и обсуждение

Ранее для исследования белка GAP-43 в ооцитах и зиготах мыши мы использовали специфические поликлональные антитела AB5220 к белку GAP-43 крысы и AB5401 к фосфорилированной (по остат-ку Ser41) форме белка GAP-43 (Millipore) [17]. В настоящей работе были использованы поликлональные антитела AB5312 к белку GAP-43 кошки

(Millipore). С помощью иммуноцитохимического окрашивания было исследовано распределение белка GAP-43 в ооцитах на стадии метафазы II и в ранних эмбрионах мыши — от одноклеточной стадии (зиготы) до стадии бластоцисты.

В ооцитах наблюдается равномерное распределение белка по цитоплазме за исключением зоны веретена деления, в области которого интенсивность окрашивания выше (рис. 1, *a*). В зиготе GAP-43 присутствует как в пронуклеусах (за исключением ядрышек), так и в цитоплазме. При этом количество белка в пронуклеусах выше, чем в цитоплазме (рис. 1, b). На стадии двух и четырех бластомеров наблюдается схожая картина: белок GAP-43 равномерно распределен по цитоплазме бластомеров и присутствует в ядрах, в ядрышках отсутствует (рис. 1, c, d).

На стадии морулы белок GAP-43 также локализован в цитоплазме и в ядрах (рис. 2, *a*, *b*). Количество GAP-43 в некоторых бластомерах может быть выше, чем в других бластомерах этого же эмбриона. На рис. 2, *a* показана морула в начале компактизации, в которой два из восьми бластомеров имеют более яркое окрашивание



Рис. 1. Локализация белка GAP-43 в ооците и ранних эмбрионах мыши: a — ооцит на стадии метафазы II (стрелкой указано положение веретена с хромосомами); b — зигота на стадии интерфазы (pb — второе полярное тельце); c — эмбрион на стадии двух бластомеров; d — эмбрион на стадии четырех бластомеров. DIC — дифференциальноинтерференционный контраст, DAPI — окрашивание ДНК, AB5312 — окрашивание GAP-43 антителами AB5312, Merge — совмещение каналов DAPI и AB5312

Fig. 1. Localization of GAP-43 protein in the oocyte and early mouse embryos: a — metaphase II oocyte (the arrow indicates the position of the metaphase spindle); b — zygote at the interphase stage (pb — the second polar body); c — embryo at the stage of two blastomeres; d — embryo at the stage of four blastomeres. DIC — differential interference contrast, DAPI — DNA, AB5312 — anti-GAP-43 antibodies, Merge — combination of DAPI and AB5312 channels



Рис. 2. Локализация белка GAP-43 в ранних эмбрионах мыши: а — морула на стадии восьми бластомеров; b поздняя морула; с — ранняя бластоциста; d — бластоциста на стадии вылупления (ICM — клетки внутренней клеточной массы, *tb* – клетки трофобласта). DIC – дифференциально-интерференционный контраст, DAPI – окрашивание ДНК, AB5312 — окрашивание GAP-43 антителами AB5312, Merge — совмещение каналов DAPI и AB5312 Fig. 2. Localization of GAP-43 protein in early mouse embryos: a - morula of eight blastomeres, b - late morula, c - early

blastocyst, d – blastocyst at the hatching stage (ICM – inner cell mass, tb – trophoblast cells). DIC – differential interference contrast, DAPI - DNA, AB5312 - anti-GAP-43 antibodies, Merge - combination of DAPI and AB5312 channels



Рис. 3. Локализация белка GAP-43, фосфорилированного по остатку Ser41, в моруле. DIC – дифференциальноинтерференционный контраст, DAPI — окрашивание ДНК, AB5401 — окрашивание pSer41-GAP-43 антителами AB5401, Merge — совмещение каналов DAPI и AB5401

Fig. 3. Localization of Ser41-phosphorylated GAP-43 protein in morula. DIC – differential interference contrast, DAPI – DNA, AB5401 – anti-pSer41-GAP-43 antibodies, Merge – combination of DAPI and AB5401 channels

82

антителами к GAP-43. Это, вероятно, свидетельствует о том, что экспрессия GAP-43 в клетках ранних эмбрионов динамически зависит от стадии клеточного цикла. Поэтому из-за несинхронности деления бластомеров внутри эмбриона количество GAP-43 в разных бластомерах может различаться.

Следующая рассмотренная нами стадия бластоциста, в которой происходит дифференцировка клеток эмбриона на трофобласт (клетки которого расположены на периферии бластоцисты) и внутреннюю клеточную массу, которая в дальнейшем формирует плюрипотентный эпибласт. На рис. 2, *с* показана ранняя бластоциста с формирующейся полостью. При этом в ядрах клеток количество белка больше, чем в цитоплазме. В бластоцисте на более поздней стадии (в процессе вылупления из *zona pellucida*) хорошо видно более яркое окрашивание клеток внутренней клеточной массы по сравнению с клетками трофобласта (рис. 2, *d*).

В данной работе мы впервые продемонстрировали экспрессию GAP-43 в клетках ранних эмбрионов мыши, начиная с зиготы до стадии бластоцисты. GAP-43 в ранних эмбрионах проявляет цитоплазматическую и ядерную существенно отличается локализацию, что от преимущественно мембранной локализации GAP-43 в нейронах. Яркое окрашивание цитоплазмы антителами к белку GAP-43 наблюдается в эмбрионах до 4-8-клеточной стадии. GAP-43 также локализован в пронуклеусах зиготы и ядрах бластомеров в 2-4-клеточных эмбрионах. Такой результат впервые демонстрирует возможность ядерной локализации у белка GAP-43. Чтобы подтвердить присутствие GAP-43 в ядре, мы использовали также антитела к фосфорилированной (по остатку Ser41) форме GAP-43 — AB5401 (Millipore) и моноклональные антитела к белку GAP-43 — G9264 (Sigma-Aldrich, США). Оба вида антител также окрашивают ядра клеток в ранних эмбрионах мыши (рис. 3, для антител G9264 данные не показаны). Окраска белка в ядрах и цитоплазме с помощью антител AB5401 говорит о том, что белок в ранних эмбрионах фосфорилирован, причем, предположительно, протеинкиназой С, как и в нейронах.

Хорошо известно, что мембранная локализация GAP-43 в нейронах связана с пальмитоилированием двух его остатков Cys3 и Cys4 [20, 21]. Поэтому можно заключить, что в ранних эмбрионах мыши GAP-43 не содержит остатков пальмитиновой кислоты. Как мы предположили ранее, это может быть следствием того, что в ранних эмбрионах экспрессируется не полная, а укороченная с N-конца форма GAP-43-2, лишенная остатков 1–4 за счет альтернативной трансляции с кодона Met5 [17]. Мы проанализировали аминокислотную последовательность GAP-43 с помошью компьютерных алгоритмов, предназначенных для предсказания субклеточной локализации белка. Программы PSORT II [22], SCLpred [23], ESLPred2 [24], Cello v.2.5 [25] предсказывают для GAP-43 ядерную локализацию, программы MultiLoc2 [26] и BUSCA [27] - ядерно-цитоплазматическую локализацию, программы cNLS Маррег [28] и NLStradamus [29] — что участок 43-57, расположенный внутри поликатионного эффекторного домена GAP-43, — это одинарный сигнал ядерной локализации («monopartite nuclear localization signal»). Интересно отметить, что для двух родственных белков — MARCKS и BASP1 — также было показано, что их эффекторные домены могут выступать в качестве сигнала ядерной локализации [30, 31]. Таким образом, можно заключить, что при отсутствии пальмитоилирования белка GAP-43 наиболее вероятная его локализация в клетке — именно локализация в ядре и цитоплазме, что и было обнаружено в настояшей работе.

Сравнивая данные, полученные с помощью антител к белку GAP-43 в этой работе (AB5312), с полученными ранее результатами по окрашиванию белка GAP-43 в ооцитах и зиготах мыши с помощью других поликлональных антител к белку GAP-43 (АВ5220) [17] можно отметить два различия. 1) Использованные в данной работе антитела АВ5312 дают более яркое окрашивание цитоплазмы, чем антитела АВ5220. На фоне яркого окрашивания цитоплазмы ооцита окрашивание тубулин-содержащих структур (мейотического веретена и центров организации микротрубочек) не так отчетливо выражено, хотя окраска в области веретена все же сильнее, чем окраска цитоплазмы (рис. 1, а). 2) Антитела АВ5312, в отличие от АВ5220, окрашивают ядра клеток и пронуклеусы в зиготе. Таким образом, антитела АВ5220 и АВ5312 имеют различную специфичность при окрашивании разных внутриклеточных пулов GAP-43 (ядерного и цитоплазматического). Хотя оба вида антител — кроличьи поликлональные, они отличаются иммуногеном: AB5220 получены к GAP-43 крысы, а AB5312 к GAP-43 кошки. Белки GAP-43 крысы и кошки имеют примерно 20 % различающихся остатков, что может объяснить существенные различия в наборе эпитопов для каждого вида антител.

Из полученных нами данных (здесь и в работе [17]) следует, что в ооцитах и клетках ранних эмбрионов мыши можно выделить три различных внутриклеточных пула белка GAP-43: а) цитоплазматический; б) ядерный; в) связанный с тубулиновыми структурами (веретеном деления и центрами организации микротрубочек). Более того, наши предварительные данные показывают, что различные пулы белка GAP-43 избирательно окрашиваются с помощью различных моноклональных антител к данному белку (данные готовятся к публикации). Это, вероятно, объясняется различными модификациями белка GAP-43 в этих пулах, что будет исследовано в дальнейшей работе.

Ранние (предимплантационные) эмбрионы вызывают интерес в связи с тем, что их клетки обладают уникальными свойствами — тотипотентностью и плюрипотентностью. Тотипотентность — способность к формированию полноценного организма из одной клетки — для плацентарных млекопитающих включает в себя способность давать начало собственно эмбриону внезародышевым тканям. Для эмбрионов И мыши показано, что тотипотентностью обладает лишь зигота и, как правило, лишь один бластомер эмбриона на двух- и четырехклеточной стадии [32]. Бластомеры эмбрионов мыши на более поздних стадиях развития уже не обладают данным свойством. На стадии поздней бластоцисты (перед имплантацией в матку) клетки внутриклеточной массы формируют эпибласт, обладающий свойством плюрипотентности. Клетки эпибласта способны дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков эмбриона, однако не способны формировать внезародышевые ткани. Они являются источником для получения плюрипотентных эмбрионально-стволовых клеток in vitro. В настоящей работе белок GAP-43 был обнаружен в тотипотентных и плюрипотентных клетках эмбриона. В связи с этим существенный интерес вызывают литературные данные об экспрессии GAP-43 в плюрипотентных клетках эмбриональной карциномы мыши. Было показано, что в этих клетках транскрипция гена GAP43 происходит с промотора, отличного от того, который обусловливает экспрессию GAP-43 в нейронах [18, 33]. GAP-43 также был обнаружен в эмбрионально-стволовых клетках человека [34] и в раковых клетках [16]. Это позволяет сделать предположение, что GAP-43 имеет особую роль в недифференцированных клетках.

Заключение

В данной работе мы впервые продемонстрировали присутствие белка GAP-43 в клетках ранних эмбрионов мыши от стадии зиготы до стадии бластоцисты и выявили существенные особенности локализации белка GAP-43 в них в сравнении с нейронами — локализацию в цитоплазме и клеточном ядре вместо плазматической мембраны. Поскольку предполагаемая роль GAP-43 в нейронах так или иначе связана с регуляцией динамики плазматической мембраны и актинового скелета, полученные нами данные позволяют сделать предположение о специфических функциях GAP-43 в тоти- и плюрипотентных клетках ранних эмбрионов. Результаты также имеют важное значение для исследования функций GAP-43 в других недифференцированных (стволовых и раковых) клетках.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Этический комитет. Выполнение исследования одобрено протоколом этического комитета Института экспериментальной медицины № 2/24 от 25.04.2024.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Наибольший вклад распределен следующим образом: Ф.М. Захарова, В.В. Захаров — концепция и дизайн исследования, аналитическая обработка результатов, написание текста статьи; Ф.М. Захарова, Н.А. Яговкина — работа с животными, проведение иммуноцитохимических экспериментов, обзор результатов; Ф.М. Захарова — работа на конфокальном микроскопе; В.В. Захаров — работа с базами данных и программами.

Additional information

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Ethics approval. The protocol of the study was approved by the local Ethics Committee of the Institute of Experimental Medicine $\mathbb{N}_{2/22}$ dated 2022 April 6.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study.

Personal contribution of each author: *F.M. Za-kharova, V.V. Zakharov* — concept and design of the study, analytical processing of the results, writing the text of the article; *F.M. Zakharova, N.A. Yagovkina* — working with animals, immunocytochemical experiments, data analysis; *F.M. Zakharova* — working on a confocal microscope; *V.V. Zakharov* — working with databases and programs.

Список литературы

- Oestreicher A.B., De Graan P.N., Gispen W.H., et al. B-50, the growth associated protein-43: Modulation of cell morphology and communication in the nervous system // Prog Neurobiol. 1997. Vol. 53, N 6. P. 627–686. doi: 10.1016/s0301-0082(97)00043-9
- Mosevitsky M.I. Nerve ending "signal" proteins GAP-43, MARCKS, and BASP1 // Int Rev Cytol. 2005. Vol. 245. P. 245–325. doi: 10.1016/s0074-7696(05)45007-x
- Denny J.B. Molecular mechanisms, biological actions, and neuropharmacology of the growth-associated protein GAP-43 // Curr Neuropharmacol. 2006. Vol. 4. P. 293–304. doi: 10.2174/157015906778520782
- Benowitz L.I., Routtenberg A. GAP-43: An intrinsic determinant of neuronal development and plasticity // Trends Neurosci. 1997. Vol. 20, N 2. P. 84–91. doi: 10.1016/s0166-2236(96)10072-2
- Aarts L.H.J., Schotman P., Verhaagen J., et al. The role of the neural growth associated protein B-50/GAP-43 in morphogenesis // Adv Exp Med Biol. 1998. Vol. 446. P. 85–106. doi: 10.1007/978-1-4615-4869-0_6
- Caroni P. Neuro-regeneration: plasticity for repair and adaptation // Essays Biochem. 1998. Vol. 33. P. 53–64. doi: 10.1042/bse0330053
- Holahan M.R., Honegger K.S., Tabatadze N., Routtenberg A. GAP-43 gene expression regulates information storage // Learn Mem. 2007. Vol. 14, N 6. P. 407–415. doi: 10.1101/lm.581907
- Holahan M. A shift from a pivotal to supporting role for the Growth-Associated Protein (GAP-43) in the coordination of axonal structural and functional plasticity // Front Cell Neurosci. 2017. Vol. 11. P. 266. doi: 10.3389/fncel.2017.00266
- Chung D., Shum A., Caraveo G. GAP-43 and BASP1 in axon regeneration: implications for the treatment of neurodegenerative diseases // Front Cell Dev Biol. 2020. Vol. 8. P. 567537. doi: 10.3389/fcell.2020.567537
- Caroni P. New EMBO members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts // EMBO J. 2001. Vol. 20, N 16. P. 4332–4336. doi: 10.1093/emboj/20.16.4332
- Tong J., Nguyen L., Vidal A., et al. Role of GAP-43 in sequestering phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to raft bilayers // Biophys J. 2008. Vol. 94, N 1. P. 125–133. doi: 10.1529/biophysj.107.110536
- Zakharov V.V., Mosevitsky M.I. Oligomeric structure of brain abundant proteins GAP-43 and BASP1 // J Struct Biol. 2010. Vol. 170, N 3. P. 470–483. doi: 10.1016/j.jsb.2010.01.010
- Forsova O.S., Zakharov V.V. High-order oligomers of intrinsically disordered brain proteins BASP1 and GAP-43 preserve the structural disorder // FEBS J. 2016. Vol. 283, N 8. P. 1550–1569. doi: 10.1111/febs.13692
- Yang Y., Shi W., Li C., et al. Growth associated protein 43 deficiency promotes podocyte injury by activating the calmodulin/calcineurin pathway under hyperglycemia // Biochem Biophys Res Commun. 2023. Vol. 656. P. 104–114. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.02.069
- Moradi F., Copeland E.N., Baranowski R.W., et al. Calmodulin-binding proteins in muscle: a minireview on nuclear receptor interacting protein, neurogranin, and growth-associated protein 43 // Int J Mol Sci. 2020. Vol. 21, N 3. P. 1016. doi: 10.3390/ijms21031016
- 16. Zheng C., Quan R.-D., Wu C.-Y., et al. Growth-associated protein 43 promotes thyroid cancer cell lines progression via epi-

thelial-mesenchymal transition // J Cell Mol Med. 2019. Vol. 23, N 12. P. 7974–7984. doi: 10.1111/jcmm.14460

- Захарова Ф.М., Захаров В.В. Обнаружение белков мозга BASP1 и GAP43 в ооцитах и зиготах мыши // Онтогенез. 2017. Т. 48, № 3. С. 192–202. EDN: YTLVRR doi: 10.7868/S0475145017030120
- Esdar C., Oehrlein S.A., Reinhardt S., et al. The protein kinase C (PKC) substrate GAP-43 is already expressed in neural precursor cells, colocalizes with PKCeta and binds calmodulin // Eur J Neurosci. 1999. Vol. 11, N 2. P. 503–516. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00455.x
- Mishra R., Gupta S.K., Meiri K.F., et al. GAP-43 is key to mitotic spindle control and centrosome-based polarization in neurons // Cell Cycle. 2008. Vol. 7, N 3. P. 348–357. doi: 10.4161/cc.7.3.5235
- Skene J.H., Virag I. Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein, GAP-43 // J Cell Biol. 1989. Vol. 108, N 2. P. 613–624. doi: 10.1083/jcb.108.2.613
- Liu Y., Fisher D.A., Storm D.R. Intracellular sorting of neuromodulin (GAP-43) mutants modified in the membrane targeting domain // J Neurosci. 1994. Vol. 14, N 10. P. 5807–5817. doi: 10.1523/jneurosci.14-10-05807.1994
- Horton P., Nakai K. Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier // Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol. 1997. Vol. 5. P. 147–152.
- Mooney C., Wang Y.-H., Pollastri G. SCLpred: protein subcellular localization prediction by N-to-1 neural networks // Bioinformatics. 2011. Vol. 27, N 20. P. 2812–2819. doi: 10.1093/bioinformatics/btr494
- Garg A., Raghava G.P.S. ESLpred2: improved method for predicting subcellular localization of eukaryotic proteins // BMC Bioinformatics. 2008. Vol. 9. P. 503. doi: 10.1186/1471-2105-9-503
- Yu C.S., Chen Y.C., Lu C.H., Hwang J.K. Prediction of protein subcellular localization // Proteins. 2006. Vol. 64, N 3. P. 643–651. doi: 10.1002/prot.21018
- Blum T., Briesemeister S., Kohlbacher O. MultiLoc2: integrating phylogeny and gene ontology terms improves subcellular protein localization prediction // BMC Bioinformatics. 2009. Vol. 10. P. 274. doi: 10.1186/1471-2105-10-274
- Savojardo C., Martelli P.L., Fariselli P., et al. BUSCA: an integrative web server to predict subcellular localization of proteins // Nucleic Acids Res. 2018. Vol. 46, N W1. P. W459–W466. doi: 10.1093/nar/gky320
- Kosugi S., Hasebe M., Tomita M., Yanagawa H. Systematic identification of yeast cell cycle-dependent nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs // Proc Natl Acad Sci. 2009. Vol. 106, N 25. P. 10171–10176. doi: 10.1073/pnas.0900604106
- Nguyen Ba A.N., Pogoutse A., Provart N., Moses A.M. NLStradamus: a simple Hidden Markov model for nuclear localization signal prediction // BMC Bioinformatics. 2009. Vol. 10. P. 202. doi: 10.1186/1471-2105-10-202
- Carpenter B., Hill K.J., Charalambous M., et al. BASP1 is a transcriptional cosuppressor for the Wilms' tumor suppressor protein WT1 // J Mol Cell Biol. 2004. Vol. 24, N 2. P. 537–549. doi: 10.1128/MCB.24.2.537–549.2004
- Rohrbach T.D., Shah N., Jackson W.P., et al. The effector domain of MARCKS is a nuclear localization signal that regulates cellular PIP2 levels and nuclear PIP2 localization // PLoS One. 2015. Vol. 10, N 10. P. e0140870. doi: 10.1371/journal.pone.0140870

- Marino M., Hiroaki T., Yuki N., et al. Totipotency of mouse zygotes extends to single blastomeres of embryos at the four-cell stage // Sci Rep. 2021. Vol. 11, N 1. P. 11167. doi: 10.1038/s41598-021-90653-1
- Zhao J.-C., Zhang L.-X., Zhang Y., Shen Y.F. The differential regulation of *Gap43* gene in the neuronal differentiation of P19 cells // J Cell Physiol. 2012. Vol. 227, N 6. P. 2645–2653. doi: 10.1002/jcp.23006
- Zhao P., Schulz T.C., Sherrer E.S., et al. The human embryonic stem cell proteome revealed by multidimensional fractionation followed by tandem mass spectrometry // Proteomics. 2015. Vol. 15, N 2-3. P. 554–566. doi: 10.1002/pmic.201400132

References

85

- 1. Oestreicher AB, De Graan PN, Gispen WH, et al. B-50, the growth associated protein-43: Modulation of cell morphology and communication in the nervous system. *Prog Neurobiol*. 1997;53(6):627–686. doi: 10.1016/s0301-0082(97)00043-9
- 2. Mosevitsky MI. Nerve ending "signal" proteins GAP-43, MARCKS, and BASP1. *Int Rev Cytol.* 2005;245:245–325. doi: 10.1016/s0074-7696(05)45007-x
- 3. Denny JB. Molecular mechanisms, biological actions, and neuropharmacology of the growth-associated protein GAP-43. *Curr Neuropharmacol.* 2006;4:293–304. doi: 10.2174/157015906778520782
- Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: An intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci*. 1997;20(2):84–91. doi: 10.1016/s0166-2236(96)10072-2
- 5. Aarts LHJ, Schotman P, Verhaagen J, et al. The role of the neural growth associated protein B-50/GAP-43 in morphogenesis. *Adv Exp MedBiol*. 1998;446:85–106. doi: 10.1007/978-1-4615-4869-0_6
- Caroni P. Neuro-regeneration: plasticity for repair and adaptation. *Essays Biochem.* 1998;33:53–64. doi: 10.1042/bse0330053
- Holahan MR, Honegger KS, Tabatadze N, Routtenberg A. GAP-43 gene expression regulates information storage. *Learn Mem.* 2007;14(6):407–415. doi: 10.1101/lm.581907
- Holahan M. A shift from a pivotal to supporting role for the Growth-Associated Protein (GAP-43) in the coordination of axonal structural and functional plasticity. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:266. doi: 10.3389/fncel.2017.00266
- Chung D, Shum A, Caraveo G. GAP-43 and BASP1 in axon regeneration: implications for the treatment of neurodegenerative diseases. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:567537. doi: 10.3389/fcell.2020.567537
- Caroni P. New EMB0 members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts. *EMBO J.* 2001;20(16):4332–4336. doi: 10.1093/emboj/20.16.4332
- Tong J, Nguyen L, Vidal A, et al. Role of GAP-43 in sequestering phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to raft bilayers. *Biophys J.* 2008;94(1):125–133. doi: 10.1529/biophysj.107.110536
- Zakharov VV, Mosevitsky MI. Oligomeric structure of brain abundant proteins GAP-43 and BASP1. J Struct Biol. 2010;170(3):470–483. doi: 10.1016/j.jsb.2010.01.010
- Forsova OS, Zakharov VV. High-order oligomers of intrinsically disordered brain proteins BASP1 and GAP-43 preserve the structural disorder. *FEBS J.* 2016;283(8):1550–1569. doi: 10.1111/febs.13692
- 14. Yang Y, Shi W, Li C, et al. Growth associated protein 43 deficiency promotes podocyte injury by activating the calmodulin/

calcineurin pathway under hyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2023;656:104–114. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.02.069

- Moradi F, Copeland EN, Baranowski RW, et al. Calmodulinbinding proteins in muscle: a minireview on nuclear receptor interacting protein, neurogranin, and growth-associated protein 43. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):1016. doi: 10.3390/ijms21031016
- Zheng C, Quan R-D, Wu C-Y, et al. Growth-associated protein 43 promotes thyroid cancer cell lines progression via epithelialmesenchymal transition. *J Cell Mol Med.* 2019;23(12):7974–7984. doi: 10.1111/jcmm.14460
- Zakharova FM, Zakharov VV. Identification of brain proteins BASP1 and GAP-43 in mouse oocytes and zygotes. *Russian Journal of Developmental Biology.* 2017;48(3):159–168. EDN: XMPBKH doi: 10.1134/S1062360417030110
- Esdar C, Oehrlein SA, Reinhardt S, et al. The protein kinase C (PKC) substrate GAP-43 is already expressed in neural precursor cells, colocalizes with PKCeta and binds calmodulin. *Eur J Neurosci.* 1999;11(2):503–516. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00455.x
- Mishra R, Gupta SK, Meiri KF, et al. GAP-43 is key to mitotic spindle control and centrosome-based polarization in neurons. *Cell Cycle*. 2008;7(3):348–357. doi: 10.4161/cc.7.3.5235
- Skene JH, Virag I. Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein, GAP-43. J Cell Biol. 1989;108(2):613–624. doi: 10.1083/jcb.108.2.613
- 21. Liu Y, Fisher DA, Storm DR. Intracellular sorting of neuromodulin (GAP-43) mutants modified in the membrane targeting domain. *JNeurosci*. 1994; 14(10):5807–5817. doi: 10.1523/jneurosci.14-10-05807.1994
- Horton P, Nakai K. Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.* 1997;5:147–152.
- Mooney C, Wang Y-H, Pollastri G. SCLpred: protein subcellular localization prediction by N-to-1 neural networks. *Bioinformatics*. 2011;27(20):2812–2819. doi: 10.1093/bioinformatics/btr494
- Garg A, Raghava GPS. ESLpred2: improved method for predicting subcellular localization of eukaryotic proteins. *BMC Bioinformatics*. 2008;9:503. doi: 10.1186/1471-2105-9-503
- Yu CS, Chen YC, Lu CH, Hwang JK. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins*. 2006;64(3):643–651. doi: 10.1002/prot.21018
- Blum T, Briesemeister S, Kohlbacher O. MultiLoc2: integrating phylogeny and gene ontology terms improves subcellular protein localization prediction. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:274. doi: 10.1186/1471-2105-10-274
- Savojardo C, Martelli PL, Fariselli P, et al. BUSCA: an integrative web server to predict subcellular localization of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W459–W466. doi: 10.1093/nar/gky320
- Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, Yanagawa H. Systematic identification of yeast cell cycle-dependent nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(25):10171–10176. doi: 10.1073/pnas.0900604106
- 29. Nguyen Ba AN, Pogoutse A, Provart N, Moses AM. NLStradamus: a simple Hidden Markov model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:202. doi: 10.1186/1471-2105-10-202
- 30. Carpenter B, Hill KJ, Charalambous M, et al. BASP1 is a transcriptional cosuppressor for the Wilms' tumor suppressor protein WT1. *J Mol Cell Biol*. 2004;24(2):537–549. doi: 10.1128/MCB.24.2.537–549.2004

- Rohrbach TD, Shah N, Jackson WP, et al. The effector domain of MARCKS is a nuclear localization signal that regulates cellular PIP2 levels and nuclear PIP2 localization. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140870. doi: 10.1371/journal.pone.0140870
- 32. Marino M, Hiroaki T, Yuki N, et al. Totipotency of mouse zygotes extends to single blastomeres of embryos at the four-cell stage. *Sci Rep.* 2021;11(1):11167. doi: 10.1038/s41598-021-90653-1
- Zhao J-C, Zhang L-X, Zhang Y, Shen YF. The differential regulation of *Gap43* gene in the neuronal differentiation of P19 cells. *J Cell Physiol.* 2012;227(6):2645–2653. doi: 10.1002/jcp.23006
- Zhao P, Schulz TC, Sherrer ES, et al. The human embryonic stem cell proteome revealed by multidimensional fractionation followed by tandem mass spectrometry. *Proteomics*. 2015;15(2-3):554–566. doi: 10.1002/pmic.201400132

Информация об авторах / Information about the authors

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Фаина Михайловна Захарова — канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной генетики; старший преподаватель кафедры эмбриологии. ORCID: 0000-0002-9558-3979; eLibrary SPIN: 9699-5744; e-mail: fzakharova@mail.ru *Faina M. Zakharova* — Cand. Sci. (Biology), Senior Research Associate at the Department of Molecular Genetics; Senior Lecturer at the Department of Embryology. ORCID: 0000-0002-9558-3979; eLibrary SPIN: 9699-5744; e-mail: fzakharova@mail.ru

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Надежда Андреевна Яговкина — студентка 2-го курса магистратуры биологического факультета, кафедра эмбриологии. ORCID: 0009-0002-3090-9621; e-mail: st110082@student.spbu.ru Nadezhda A. Yagovkina — 2nd year graduate student of Faculty of Biology, Departments of Embryology. ORCID: 0009-0002-3090-9621; e-mail: st110082@student.spbu.ru

ФГБУН «Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук», Санкт-Петербург, Россия Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Владислав Викторович Захаров — канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории № 5 (природных полимеров). ORCID: 0000-0002-7871-632X; eLibrary SPIN: 1203-0639; e-mail: vlad.v.zakharov@mail.ru *Vladislav V. Zakharov* — Cand. Sci. (Biology), Research Associate at the Laboratory No. 5 (natural polymers). ORCID: 0000-0002-7871-632X; eLibrary SPIN: 1203-0639; e-mail: vlad.v.zakharov@mail.ru

🖂 Контактное лицо / Corresponding author

Фаина Михайловна Захарова / Faina M. Zakharova Адрес: Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12 Address: 12 Academician Pavlov St., Saint Petersburg, 197022, Russia E-mail: fzakharova@mail.ru