

Санкт-Петербургский Государственный Университет

Косицын Юрий Михайлович

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИ(С)-СВЯЗЫВАЮЩИХ КН-ДОМЕННЫХ БЕЛКОВ В
СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ**

Выпускная квалификационная работа по основной образовательной программе бакалавриата

Научный руководитель:
профессор, д.б.н., Подгорная О. И.

Санкт-Петербург

2018

Список сокращений

DICE - (differentiation control element)

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

hnRNPК - heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K

КН - домен гомологии hnRNPК (K Homology)

КNS -К-специфический ядерный челночный домен

NLS - nuclear localization signal

PBS – фосфатно-солевой буфер

PCBP - Poly(C)-binding protein

НК - нуклеиновая кислота

ЭС – эмбриональные стволовые (клетки)

Содержание

Список сокращений	4
Введение	5
Глава 1. Обзор литературы	7
1.1. Введение	7
1.2. Структура поли(С)-связывающих белков	7
1.3. Разнообразие изоформ поли(С)-связывающих белков	9
1.4. Посттрансляционные модификации	10
1.5. Локализация поли(С)-связывающих белков	10
1.6. Функции поли(С)-связывающих белков	11
1.6.1. Регуляция транскрипции	11
1.6.2. Регуляция трансляции	12
1.6.3. Участие в сплайсинге	13
1.6.4. Участие в метаболизме железа	13
1.6.5. Регуляции плюрипотентности	14
1.6.6. Роль в развитии рака	15
Глава 2. Материалы и методы	17
2.1. Получение CRISPR/Cas9-плазмиды для нокаута <i>PCBP2</i> в ЭС клетках мыши	17
2.1.1. Сборка плазмиды с помощью лигирования	17
2.1.2. Трансформация хемикомпетентных бактерий	17
2.1.3. Выделение плазмидной ДНК из <i>E. coli</i>	18
2.1.4. Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле	19
2.2. Исследование продукции изучаемых белков в ЭС клетках мыши	19
2.2.1. Культивирование эмбриональных стволовых клеток мыши	19
2.2.2. Трансфекция эмбриональных стволовых клеток мыши	20
2.2.3. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток	20
2.2.4. Измерение интенсивности флуоресценции клеток	21
2.2.5. Статистические методы	21
Глава 3. Результаты и обсуждение	22
3.1. Получение CRISPR/Cas9-плазмиды для нокаута <i>PCBP2</i> в ЭС клетках мыши	22

3.2. Трансфекция оверэкспрессирующими и нокаутными плазмидами ЭС клеток и их окраска на исследуемые белки с помощью методов иммуноцитохимии	24
3.2.1. Сверхпродукция поли(С)-связывающих белков и продукция Oct-4	25
3.2.2. Нокаут генов, кодирующих поли(С)-связывающие белки и продукция Oct-4	25
3.3. Сравнение уровней продукции поли(С)-связывающих белков с уровнем продукции Oct-4	28
3.3.1 Влияние сверхпродукции hnRNP К, PCBP1, PCBP2 на уровень продукции Oct-4	28
3.3.2 Влияние нокаута <i>PCBP1</i> , <i>PCBP2</i> на продукцию Oct-4	28
Выводы	34
Список литературы	35

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия благодаря развитию молекулярной и клеточной биологии возросли потенциальные возможности для биологии и медицины. Стволовые клетки имеют ряд уникальных особенностей: неограниченное деление в культуре и способность к дифференцировке в различные типы тканей и органов. Занимаясь биологическими исследованиями, возможно эффективно проводить изучение генных нокаутов - так, после разработки методов получения эмбриональных стволовых клеток стало возможным проведение нокаута генов на мыши (Evans et al., 1981). Также одним из перспективных направлений в медицине является заместительная клеточная/тканевая терапия стволовыми клетками. Однако существует немало препятствий в этой области, например, туморогенный эффект, вызываемый неконтролируемым делением плюрипотентных клеток. Попадание в организм мыши всего нескольких клеток вызывает развитие опухоли.

Таким образом, прежде чем эффективно интегрировать в терапию данную технологию, необходимо досконально изучить фундаментальные вопросы связанные с молекулярными механизмами регуляции стволовых клеток.

Поли(С)-связывающие белки, присутствуют во всех эукариотических и прокариотических организмах. Поли(С)-связывающие белки отвечают за огромное количество функций в клетке, например, сплайсинг, транскрипция, трансляция и т.д. К настоящему времени существует большое количество исследований посвященных влиянию этих белков на развитие и супрессию рака и участию в транспорте важнейшего металла - железа. В наши дни, одной из дискуссионных функций этих белков является их влияние на плюрипотентные свойства клеток (например, Thompson et al. 2015). Согласно данным нашей лаборатории, поли(С)-связывающие белки hnRNPК и PCBP1-PCBP3 связываются с сайтом 2А дистального энхансера гена *Oct-4*. Ген *Oct-4* один из ключевых участников поддержания плюрипотентного состояния клеток. Возникла необходимость изучить возможную корреляцию между различными уровнями продукции поли(С)-связывающих белков и экспрессией *Oct-4*.

Целью данной работы является: получение предварительных данных о влиянии сверхпродукции и понижения уровня продукции поли(С)-связывающих белков на уровень продукции белка *Oct-4* в эмбриональных стволовых клетках мыши.

В соответствии с поставленной целью, необходимо решить ряд задач:

1. Получить CRISPR/Cas9-плазмиду для нокаута *PCBP2*.
2. Трансфецировать оверэкспрессирующими и нокаутными плазмидами ЭС клетки мыши и оценить изменение уровня продукции поли(С)-связывающих белков и Oct-4.
3. Оценить возможное влияние уровня продукции белков hnRNP K, PCBP1, PCBP2 на уровень синтеза белка Oct-4.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

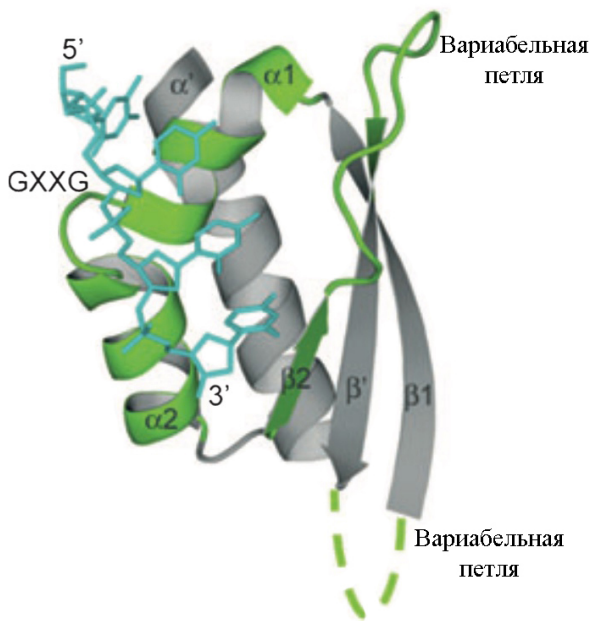
1.1. Введение

Несколько десятилетий назад РНК-связывающие белки были классифицированы на основе их связывания с гомополимерами нуклеиновых кислот (Swanson et al. 1988). Так, высокой афинностью связывания с полицитозином характеризуются поли(С)-связывающие белки (PCBP). У млекопитающих существует два класса данных белков : hnRNP К/Ј и PCBP1-4 (или α CP1- α CP4). Показано, что все представители данного семейства белков связаны эволюционной историей. Был найден ряд гомологов поли(С)-связывающих белков в низших организмах как эукариот так и прокариот. Таким образом, белки семейства PCBP появились на ранних этапах эволюции и они выполняют важнейшие функции (Makeyev, Liebhaber, 2002).

1.2. Структура поли(С)-связывающих белков

Гены кодирующие поли(С)-связывающие белки находятся в пяти локусах, у человека и мыши эти локусы находятся в разных хромосомах, существуют также дополнительные изоформы, благодаря альтернативному сплайсингу (Tommerup, Leffers, 1996; Makeyev, Liebhaber, 2000).

Общей чертой всех поли(С)-связывающих белков является наличие трех доменов гомологии hnRNP К (известные как КН-домены); РНК-связывающие мотивы состоят примерно из 70 аминокислотных остатков. Два домена КН сгруппированы вблизи N-конца и третий КН домен на карбоксильном конце; они разделены промежуточной последовательностью где и возникает наибольшая структурная дивергенция между членами семейства (Gibson et al., 1993). Распознавание трех цитозинов возможно благодаря связям между α 1-спиралью, α 2-спиралью, консервативной петлей GXXG и вариабельной петлей между β 2-цепью и β '-цепью (Valverde et al., 2008) (Рис. 1). В основе таких взаимодействий лежат водородные связи, ван-дер-ваальсовы и электростатические силы. Важно, что структура доменов КН не определяет их специфичность связывания с полицитозином (Thisted et al., 2001).



Структура каждого домена КН состоит из трех α -спиралей и трех β -нитей: $\beta 1-\alpha 1-\alpha 2-\beta 2-\beta 3-\alpha 3$ (рис.1). Поли(С)-связывающие белки также имеют сигнал ядерной локализации (NLS). NLS I находится между доменами КН2 и КН3, а NLS II локализован в домене КН3. Преимущественно расположенные в ядре РСВР1 и РСВР2 содержат как первую, так и вторую сигнальные последовательности, тогда как РСВР3, РСВР4 и hnRNP К содержат только вторую. Кроме того, hnRNP К содержит hnRNP К-специфический

Рис. 1. Взаимодействие домена КН I с НК. GXXG - консервативная петля. Зеленой пунктирной линией показано местоположение вариательной петли в доменах КН типа II. (По Valverde et al. 2008, с изменениями).

ядерный челночный (hnRNP К nuclear shuttling, KNS) домен, расположенный между КН II и КН III. hnRNP К также содержит К-белковый интерактивный (interactive) домен (hnRNP К

interactive, KI), расположенный между вторым и третьим КН (Choi et al., 2009). Благодаря этому домену hnRNP К отличны от других поли(С)-связывающих белков своей универсальностью: возможны взаимодействия с несколькими белками через интерактивный

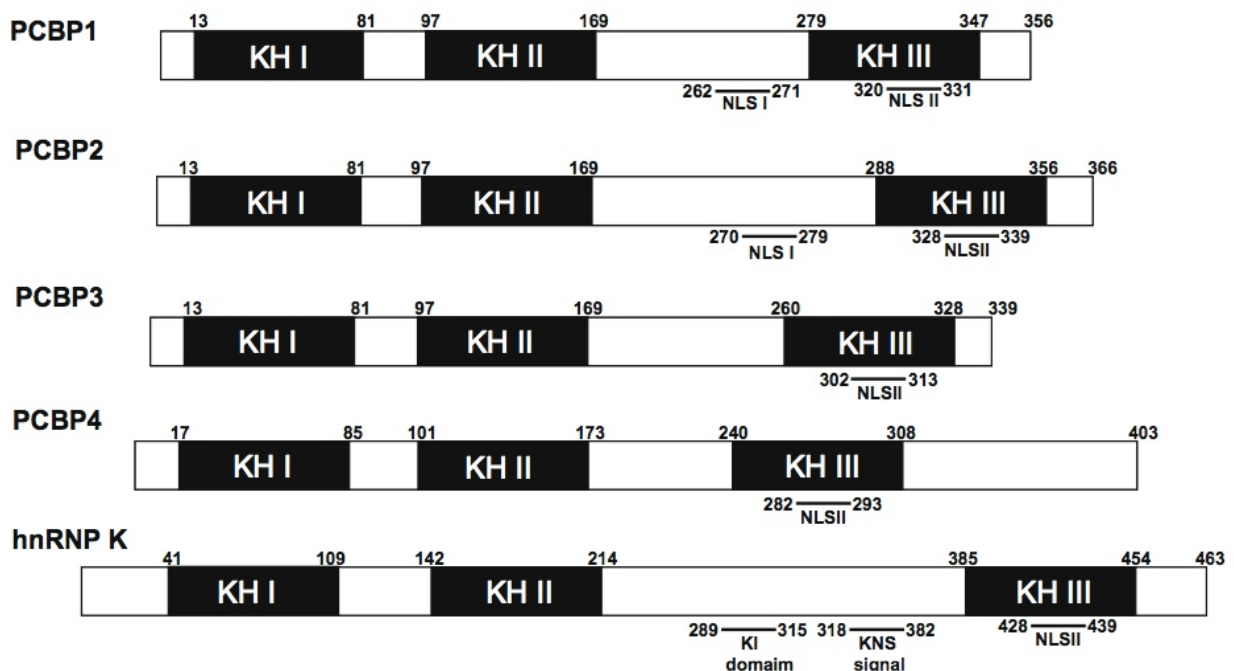


Рис. 2. Схема доменной структуры РСВР. Показаны пять членов семейства РСВР. Пояснения в тексте. (Из Choi et al., 2009).

домен (Bomsztyk et al., 2004). Поэтому hnRNP К может принимать участие в широком диапазоне молекулярных взаимодействий, что позволяет ему играть множество ролей в различных клеточных процессах.

1.3. Разнообразие изоформ поли(С)-связывающих белков

Наличие различных изоформ поли(С)-связывающих белков, вероятно, способствует их различным функциям. Ген *PCBP1* не содержит интронов и кодирует один белок. Исследование мРНК *PCBP2* выявили альтернативный сплайсинг нескольких экзонов. В основной изоформе *PCBP2*, *PCBP-2KL*, отсутствует сегмент из 31 аминокислот (экзон 8a; Рис. 3). Доказательства альтернативного сплайсинга *PCBP3* не были найдены. Два основных варианта альтернативного сплайсинга для *PCBP4* были обнаружены в тканях мыши и человека. Эти две формы различаются по длине их последовательности на С-концах.

Идентифицированы четыре альтернативных транскрипта hnRNP К (рис.3). Предполагается, что hnRNP J, представляет собой изоформу hnRNP К. Экзон, отсутствующий в hnRNP J мРНК, расположен между доменами КН I и II транскрипта hnRNP К (Makeyev, Liebhaber, 2002).

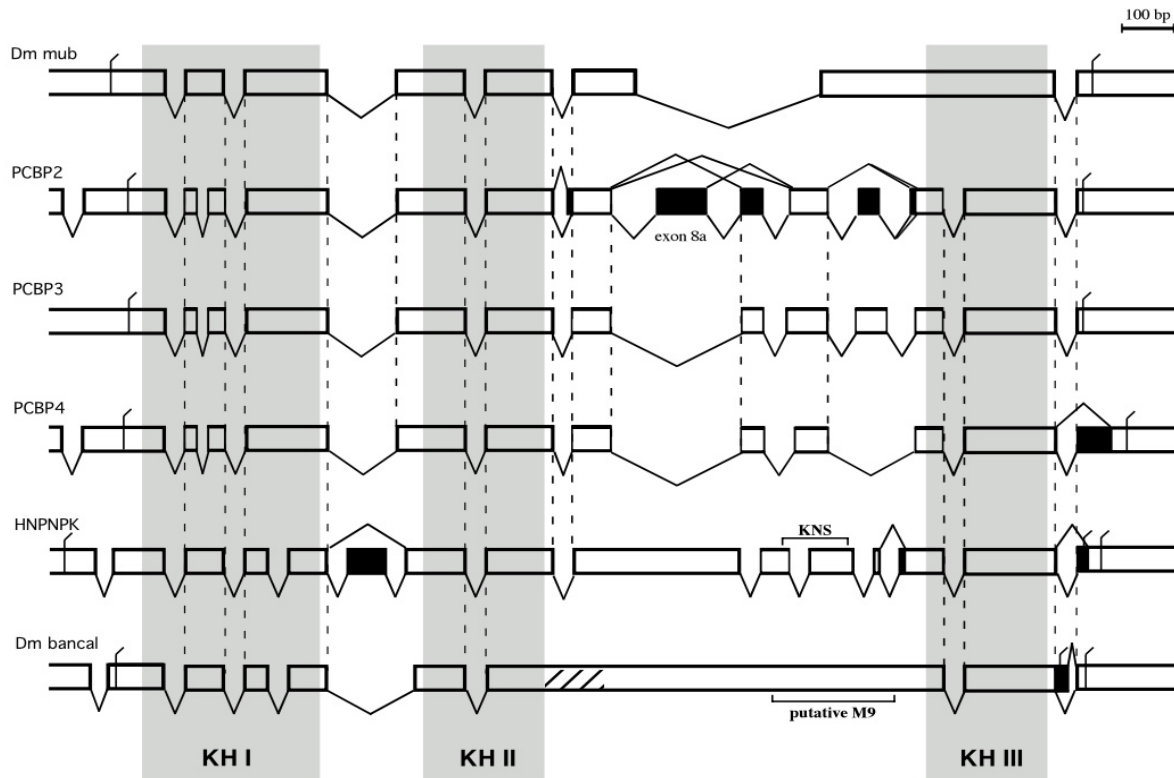


Рис. 3. Сравнение мРНК поли(С)-связывающих белков млекопитающих и *Drosophila* (Dm). Экзоны показаны блоками; черные блоки представляют собой варианты сплайсинга. Регулярные последовательности указаны ниже транскрипта, а альтернативные варианты сплайсинга указаны над транскриптом. Области транскрипта, кодирующие КН домены, обозначены серым цветом. (Из Makeyev et al., 2002)

1.4. Посттрансляционные модификации.

Посттрансляционные модификации еще больше увеличивают различие структуры поли(С)-связывающих белков и их потенциальные функции; модификации важны для их способности функционировать в качестве транскрипционных факторов, которые связываются со специфическими промоторами генов и регулируют их.

Фосфорилирование PCBP1 и PCBP2 приводит к заметному уменьшению активности связывания с полицитозинном (Leffers et al., 1995). Киназы ERK фосфорилирует hnRNP К по серинам 284 и 353. Киназы Src и Lck могут фосфорилировать белок hnRNP К по тирозинам 230, 234 и 236 (Ostrowski et al. 2000). Домен KI hnRNP К содержит серин 302, который также выступает в качестве сайта для фосфорилирования протеинкиназой Cδ (Schullery et al., 1999). Эти структурные модификации увеличивают ассоциацию hnRNP К с протоонкогеном Vav, транскрипционными репрессорами Eed, и протеинкиназами Lck, Src и Cd. Однако такое фосфорилирование, снижает РНК-связывающую активность *in vitro* (Choi et al., 2009).

Аргининметилтрансфераза 1 метилирует hnRNP К. Такое метилирование может регулировать взаимодействие hnRNP К с киназами семейства Src (Ostareck-Lederer et al., 2007; Chiou et al. 2007). Метилирование аргининов hnRNP К повышает его сродство к белку p53. Напротив, при подавлении метилирования hnRNP К ослабляется рекрутинг p53 на промотор гена p21, что уменьшает транскрипционную активность p53 (Chen et al., 2008). Также фосфорилирование hnRNP К было отмечено в ответ на введение *in vivo* факторов роста, окислительный стресс и другие изменения во внеклеточной среде (Ostrowski et al., 1991; Van Seuning et al., 1995; Schullery et al., 1999).

1.5. Локализация поли(С)-связывающих белков

Были выявлены различные места локализации: hnRNP К, PCBP1 и PCBP2 преимущественно находятся в ядре (Berry et al., 2009). Наоборот, PCBP3 и PCBP4 локализованы в цитоплазме. (Chkheidze et al., 2003). Однако, если белок PCBP1 находится в цитоплазме, то он может быть фосфорилирован киназой Pak1, что приводит к его перемещению из цитоплазмы в ядро. Напротив, фосфорилирование некоторыми киназами (например, MAPK) hnRNP К который локализуется в нуклеоплазме, приводит к его накоплению в цитоплазме (Habelhah et al., 2001). hnRNP К млекопитающих содержит NLS и

KNS, что позволяет данному белку перемещаться двунаправленно через ядерный поровый комплекс (Michael et al., 1997). Интересно, что ортолог hnRNP K у *Drosophila* - Hrb57A, распределен в ядрах дрозофилы аналогично локализации его аналога у млекопитающих (Buchenau et al., 1997; Makeyev, Liebhaber, 2002).

1.6. Функции поли(С)-связывающих белков.

Поли(С)-связывающие белки участвуют в огромном числе биологических процессов: стабилизация мРНК, трансляционный сайленсинг, подавление/усиление трансляции, участие в сплайсинге мРНК, как транскрипционные факторы связываясь с промоторами многих генов индуцируют апоптоза, являются шаперонами железа. Кроме этого поли(С)-связывающие белки функционируют как супрессоры/стимуляторы опухолевого роста. Ниже рассмотрим их некоторые функции.

1.6.1. Регуляция транскрипции.

Поли(С)-связывающие белки участвуют во множестве процессов связанных с транскрипцией. Например, hnRNP K ассоциируется с TATA-связывающим белком (TBP) и стимулирует транскрипцию (Michelotti et al. 1996). Также hnRNP K функционирует в качестве активатора транскрипции для раннего промотора SV40, гена никотинового рецептора ацетилхолина, промотора гена с-тус человека, нерецепторной тирозинкиназы, гена SRC человека, промотора eIF4E и проксимального промотора μ -опиоидного рецептора мыши (Choi et al., 2009).

В ходе ответа на повреждение ДНК, p53 и hnRNP K связывается с промоторами генов регулируемых белком p53. Однако hnRNP K также может выступать в качестве транскрипционного репрессора. Он является мощным супрессором генов, регулируемых тимидин-киназой. hnRNP K сам не может связываться с промотором тимидинкиназы человека, но может подавлять транскрипцию, ингибируя взаимодействие hnRNP A1 и p38AUF с этим промотором (Lau et al., 2000). Также hnRNP K связывает одноцепочечную ДНК внутри промотора CD43 и опосредует ее репрессию (Silva et al., 2002).

Показано, что hnRNP K играет важную роль в посттранскрипционной регуляции генов, участвующих в цитоскелетной организации аксонов, и поэтому hnRNP K оказывается

существенным для их развития. При нокадауне *hnRNP K* отсутствовал рост аксонов у зародышей *Xenopus* в эмбриональном периоде (Liu et al., 2008).

PCBP1 вместе с PCBP2 играет важную роль в транскрипционной регуляции. PCBP1 связывается в сочетании с PCBP2 и *hnRNP K* с 26-нуклеотидным полипиримидиновым участком в проксимальном промоторе гена μ -опиоидного рецептора мыши, тем самым стимулируя его транскрипцию в нейронах (Malik et al., 2006).

1.6.2. Регуляция трансляции.

PCBP1 стимулирует трансляцию полиовируса путем взаимодействия с петлей IRES молекулы мРНК (Gamarnik, Andino 1997) и мРНК кодирующей кошаперон Bag1 (Pickering et al., 2004). Доказано, что PCBP1 вызывает репрессию трансляции мРНК вируса папилломы человека 16 типа (HPV-16), *disabled-2* (*Dab2*). Также, PCBP1 и PCBP2 связываются с 3'-UTR всех изоформ нейрофиламентов, которые широко экспрессируются в нейронах. Сила взаимодействия между транскриптами нейрофиламентов, PCBP1 и PCBP2 изменяется во время постнатального развития в коре головного мозга крысы. Обнаружено, что *hnRNP K* взаимодействует с мРНК, кодирующей гликогенсинтазу-3 β (*GSK3 β*), где он регулирует различные сигнальные пути во время дифференцировки остеокластов. Также, обнаружено что *hnRNP K*, регулирует уровень АТФ при клеточном стрессе, путем непосредственного взаимодействия с мРНК кодирующей белок *RBM42* (Geuens et al., 2016).

Перемещение PCBP1 - PCBP2 в ядре и в цитоплазме также способствует метаболизму мРНК и регуляции генов, таких как альфа-глобин. Показано, что PCBP1 - PCBP2 может связываться с транскриптом гена альфа-глобина в ядре, что ускоряет сплайсинг и ядерный 3'-процессинг, а затем сопровождает мРНК альфа-глобина в цитоплазму, где стабилизирует мРНК и тормозит ее период полураспада. Показано участие поли(С)-связывающих белков в накоплении гемоглобина в клетках-предшественниках эритроцитов. PCBP1/PCBP2 непосредственно взаимодействует с 3'-концом мРНК кодирующей альфа-глобин с образованием «альфа-комплекса», который стабилизирует мРНК (Chen et al., 2013).

1.6.3. Участие в сплайсинге.

PCBP1 является модулятором альтернативного сплайсинга, например транскрипта гена CD44. При фосфорилировании PCBP1 переходит в ядро, где данный белок способствует альтернативному сплайсингу мРНК, кодирующей CD44 (Meng et al., 2007). Кроме того, обнаружено, что PCBP1 также отрицательно контролирует альтернативный сплайсинг мРНК CD44 путем образования комплекса с важным фактором плюрипотентности и роста клеток - белком TNAР11 (Lian et al., 2012).

Показана роль PCBP1 в процессинге РНК вируса иммунодефицита человека 1, где PCBP1 взаимодействует с определенным сайтом сплайсинга мРНК и тем самым изменяет синтез белка (Hadian et al., 2009).

1.6.4. Участие в метаболизме железа.

Поли(С)-связывающие белки служат шаперонами ионного железа в ядре и цитозоле, связывая железо и транспортируя его на ферменты для хранения и экспорта. Обнаружили, что PCBP2 связывается с трансмембранным металлотранспортером ферропортином, что способствует оттоку цитозольного железа. PCBP2 также может функционировать как железосодержащий шаперон для белка ферритина. PCBP1 доставляет ионы железа на ферритин, что является одним из важнейших процессов. Также PCBP1 и PCBP2 необходимы для переноса ионов железа на фермент гидроксилазу деоксипузина (ДОНН). Стало известно, что постнатальный дефицит PCBP1 приводит к снижению концентрации гема в кроветворных тканях и развитию микроцитарной анемии. Таким образом, опосредованное PCBP1 перемещение железа через ферритин важно для гемопоэза.

Выявлена антагонистическая роль PCBP2. С одной стороны его дефицит оказывает ингибирующее действие на транспорт железа на ферменты, не содержащие гема. Однако если дифференцировка эритроцитов, сопровождается дефицитом PCBP2 вырастает количество перенесенного железа на ферритин, увеличивается эффективность связывания PCBP1 с ферритином и включение железа в гем. Таким образом, решающим фактором в

клетках, с низким содержанием PCBP2, является уровень продукции PCBP1 (Philpott et al., 2017).

Помимо этого, показано, что PCBP2 в комплексе с цитозольным железом может регулировать активность синтеза miRNA. PCBP2 связывается с рибонуклеазой Dicer, что активирует процессинг пре-miRNA. Вместе с тем, цитозольное железо модулирует связь между PCBP2 и рибонуклеазой, а также их мультимеризацию и способность связываться с пре-miRNA. Все это оказывает в конечном итоге влияние на сам процессинг (Li et al., 2012).

1.6.5. Регуляция плюрипотентности.

Поли(С)-связывающие белки играют важную роль в регуляции плюрипотентности. Нокаут hnRNP K приводил к потере плюрипотентных свойств, что индуцировало запуск дифференцировки эндодермы (Thompson et al., 2015). hnRNP K синтезируется на высоком уровне во время эмбрионального развития в центральной и периферической нервной системе, поскольку нейроны нуждаются в жесткой регуляции гомеостаза молекул мРНК и поэтому они очень уязвимы при дисфункции поли(С)-связывающих белков (Blanchette et al., 2006). В созревшем ооците, PCBP1 играет ключевую роль в подавлении транскрипционной активности, что служит предпосылкой для успешного прохождения мейоза, оплодотворения и раннего эмбрионального развития (Xia et al., 2012).

Белки PCBP2 и PCBP1, обильно синтезируются во множестве типов тканей. Эмбрионы с нокаутом *PCBP1* оказывались нежизнеспособными на стадии преимплантации. Напротив, эмбрионы с нокаутом *PCBP2* нормально развивались до 12,5 - 13,5 дней после оплодотворения, а после этого они погибали, что исследователи связывают с аномалиями развития сердечно-сосудистой системы и нарушением гемопоеза. Интересно, что мыши, гетерозиготные по аллелям *PCBP1* или *PCBP2* проявляли лишь небольшие снижения массы тела после рождения. Эти данные показывают, что PCBP1 и PCBP2 важны для эмбрионального развития мыши и оказывают заметное влияние на жизнеспособность эмбриона (Ghanem, 2016).

Подробно исследован механизм посттранскрипционной регуляции некоторых генов в ходе гемопоеза. Так, при развитии эритроцитов, митохондрии деградируют, под влиянием ретикулоцит-15-липоксигеназы (r15-LOX). На ранней стадии, hnRNP K и PCBP1 связываются с последовательностью DICE в 3'-конце молекулы мРНК кодирующей r15-

LOX, что приводит к трансляционному замалчиванию гена. В итоге, комплекс hnRNP K-PCBP1 ингибирует присоединение 60S рибосомной субъединицы к иницирующему кодону.

В поздней дифференцировке, фосфорилирование hnRNP K тирозинкиназой c-Src блокирует связывание hnRNP K-PCBP1 с элементом DICE, что приводит к трансляции мРНК кодирующей ретикулоцит-15-липоксигеназу. Интересно, что c-Src, регулятор связывающей активности hnRNP K, контролируется самим hnRNP K на ранней стадии созревания эритроцитов. hnRNP K непосредственно связывается с 3' UTR мРНК кодирующей c-Src и ингибирует ее трансляцию (Kuhn et al., 1999).

1.6.6. Роль в развитии рака.

Поскольку поли(С)-связывающие белки являются регуляторами экспрессии генов, как на транскрипционном, так и на трансляционном уровне, то дефекты в их продукции могут привести к развитию рака. Например, p21WAF - киназный ингибитор, который подавляет рост опухолей. PCBP1 вместе с PCBP2 стабилизирует мРНК кодирующую p21WAF. Кроме того, PCBP1 повышая стабильность мРНК ДНК-полимеразы η , которая является мишенью для белка p53, подавляет опухолевый рост. Другим примером, где PCBP1 репрессирует трансляцию мРНК, участвующих в развитии опухоли, является его участие в эпителиально-мезенхимальном переходе (Geuens et al., 2016).

Нокаут *hnRNP K* у мышей, приводил к образованию опухолей (Gallardo et al., 2015). hnRNP K регулирует экспрессию как онкогенов, так и опухолевых супрессоров, таких как CDKN1A (p21), SRC, HDM2, EIF4E и прямо связывается с промоторами этих генов. hnRNP K непосредственно взаимодействует с промотором гена *MYC*, что приводит к увеличению экспрессии *c-Myc*. Считается, что hnRNP K регулирует синтез белка c-Myc путем связывания с полицитозиновыми областями в 5' UTR транскрипта *C-MYC*, что способствует посадке рибосомы и дальнейшему синтезу.

Два классических опухолевых супрессора и онкогенных пути на которые влияет hnRNP K, влияющих на транскрипцию и трансляцию, представляют собой пути p53 / p21 и c-Myc, соответственно. hnRNP K может играть ключевую роль в подавлении роста опухоли. hnRNP K фосфорилируется киназами ATM и ATR после повреждения ДНК, что приводит к

активации белка p21. После облучения ультрафиолетом hnRNP K сумоилируется, что приводит к усилению p53-зависимой транскрипционной активации p21.

Снижение продукции hnRNP K влияло на экспрессию миелоидных факторов дифференцировки (Gallardo et al., 2016).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Получение CRISPR/Cas9-плазмиды для нокаута *PCBP2* в ЭС клетках мыши.

2.1.1 Сборка плазмиды с помощью лигирования.

Подбор сиквенса одноцепочечных олигонуклеотидов, кодирующих гид-РНК PCBP2 осуществляли на сайте www.crispr.mit.edu. Олигонуклеотидная вставка комплементарна части последовательности ДНК гена интереса. После подбора последовательности (caccgacaccggtgtgattgaagg), олигонуклеотиды были синтезированы в компании Евроген. После чего, в пробирке смешивали равное количество комплементарных олигонуклеотидов (1,5 мкл, 100 нМ), 6 мкл воды, 1 мкл лигазного буфера Т4. Пробирки инкубировали в течении 4 минут при 94°С, после чего температуру в приборе постепенно снижали до комнатной. После отжига на олигонуклеотидах получались липкие концы, благодаря которым процедуру лигирования проводили без их энзиматического расщепления.

Для проведения лигирования смешали 0,5 мкл раствора олигонуклеотидов, 1 мкл линейризованного вектора рХ330, экспрессирующего GFP (заказан в компании Addgene, #42230, рис. 4), разрезанного в сайтах Bbs1 (50 нг/мкл), 2 мкл Т4 буфера (10X), 0.2 мкл Т4 лигазы и 16,3 мкл воды. Полученную смесь инкубировали 1 час при 22°С.

2.1.2 Трансформация хемикомпетентных бактерий.

К 40 мкл хемикомпетентной культуры *E. coli* штамм HB101 добавляли 5 мкл трансфецирующей смеси (после проведения лигирования) на льду, смесь инкубировали в течении 1 минуты при 40°С и возвращали на лед. Добавляли 700 мкл среды Lysogeny broth (LB) без антибиотиков и оставляли на 40 минут при 37°С в термостате.

Далее культуру центрифугировали 17 сек при 16,1 g. Осадок переносили на агар-агар с ампициллином (100 мкг/мл) и распределяли центробежными движениями стерильным шпателем по твердой агарозной среде. Чашки Петри инкубировали в течении ночи при 37°С.

На следующий день колонии из каждой чашки были помещены в жидкую 1X среду LB (содержащей 100 мкг/мл ампициллина) в объеме 6 мл и выращивали при 37°С в течении ночи. Через 18 часов среду с бактериями переносили в стерильные конические колбы содержащие 100 мл 1X LB, с ампициллином и инкубировали в термостате при 37°С в

течении ночи. Затем среду с бактериями центрифугировали при 16,1 g в течении 15 минут.

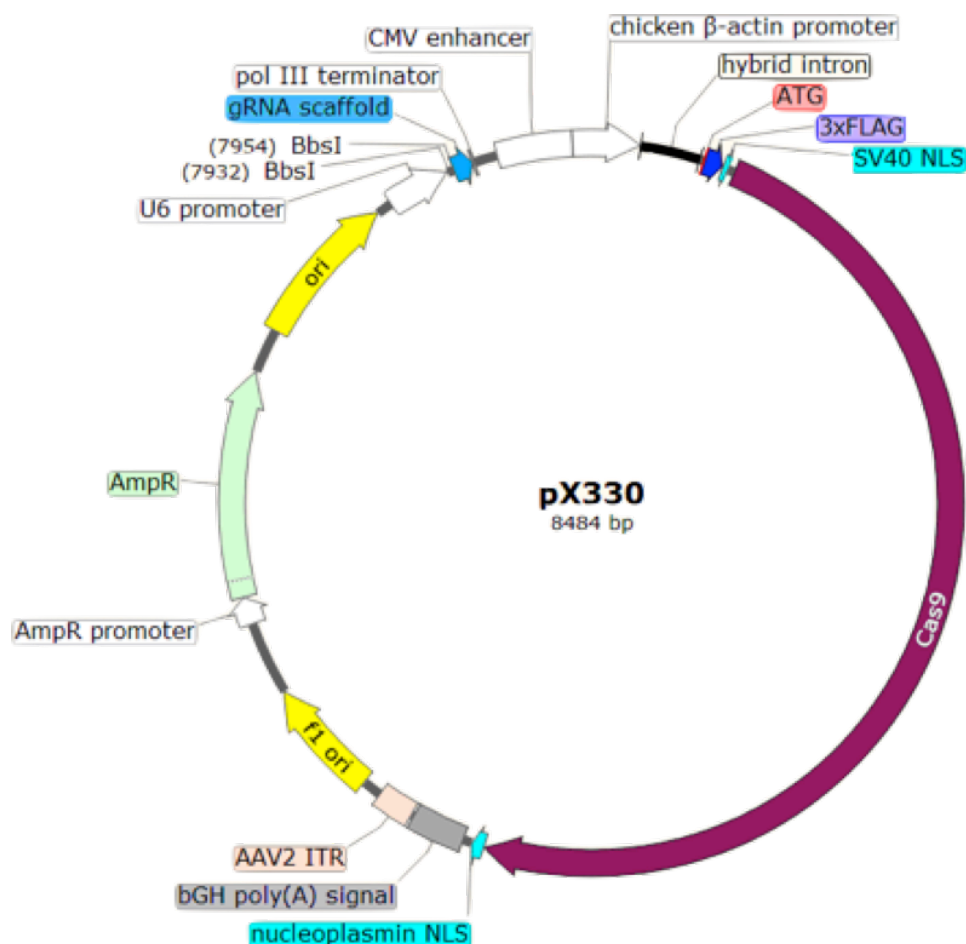


Рис. 4. Карта плазмидного вектора pX330 (*ген GFP не отображен*). (источник: www.aniland.info)

2.1.3. Выделение плазмидной ДНК из *E. coli*.

К осадку трансформированных бактерий добавляли 4 мл лигирующего буфера (50 мМ глицин, 10 мМ ЭДТА - pH 8.0, 25 мМ Tris-HCl - pH 8.0,) и тщательно суспендировали. Затем, добавляли 8 мл лизирующего буфера (0,2 N NaOH, 1 % SDS), после чего произошел лизис бактерий и раствор стал полупрозрачным. После лизиса добавили 6 мл нейтрализующего буфера (3 M ацетата калия, 11,5 % уксусной кислоты), что сопровождалось выпадением осадка белого цвета. Осадок аккуратно перемешивали и центрифугировали пробирки в течении 15 мин при 16,1 g, 4°C. Супернатант отбирали и к нему добавляли равный объем изопропанола и центрифугировали 16,1 g 1 час при 4°C. Осадок подсушивали и растворяли в

1 мл воды, суспендировали пипетированием, затем добавляли раствор 1 мл 10 М хлорида лития, перемешивали и инкубировали при -20°C в течении 10 минут. После центрифугирования при 4°C 16,1 g в течении 10 минут собирали супернатант.

ДНК супернатанта осаждали равным объемом изопропанола при -20°C в течении 10 минут и центрифугировали при 16,1 g в течении 10 минут, 4°C . Осадок немного (5-15 мин при ком. темп.) подсушивали, промывали 2 раза в 70% этаноле и растворяли в 200 мкл раствора Tris-ЭДТА (100 mM Tris-HCl - pH 7.6, 10 mM ЭДТА - pH 8.0) .

Для проверки качества полученных плазмид провели электрофорез в 1,5 % агарозном геле , с последующей визуализацией с помощью аппарата ChemiDoc. Для удаления остатков РНК обрабатывали образцы РНКазой А при концентрации 1мкг/мл. РНКазу А добавляли в образцы и инкубирована при 37°C в течении 30 минут. После чего плазмидную ДНК очищали переосаждением в 70 % этаноле два раза. Очищенные плазмиды секвенированы в компании Евроген.

2.1.4 Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле.

Для проведения электрофореза использовали гель с 1,5% содержанием агарозы и бромистого этидия (Sigma) в конечной доле 0.04 %. Гель помещался в камеру для электрофореза, в лунки вносили образцы, приготовленные по следующей схеме: 1 мкл ДНК, 1 мкл загрузочного буфера (BioLabs) и 4 мкл дистиллированной воды. Также в отдельную лунку вносили 5 мкл молекулярного маркера (#SM0333; Thermo Scientific).

В камеру подавался постоянный электрический ток 400 мА напряжением 70 В в течении 20 минут.

2.2. Исследование продукции изучаемых белков в ЭС клетках мыши.

2.2.1. Культивирование эмбриональных стволовых клеток мыши.

Эмбриональные стволовые клетки мыши были взяты из криоколлекции клеточных культур нашей лаборатории – их размораживали от -80°C до комнатной температуры на водяной бане. Посев клеток осуществляли количестве 50 тыс. клеток на лунку в 24-луночный планшет. Перед посевом лунки инкубировали с 0,1 % водным раствором желатина (Sigma, Германия), в объеме достаточном для покрытия дна при 37°C в течении 30 минут. Раствор

аспирировали, промывали 1x раствором PBS. Клетки культивировали в среде KnockOut DMEM (Gibco, США) с добавлением фактора ингибирования лейкемии Lif (1:5000) 15% ФБС, 2мМ L-глутамин, и 1x раствора пенициллина и стрептомицина при 37°C в клеточном инкубаторе (New Brunswick Galaxy 170 R). Атмосфера для инкубации содержала CO₂ - 5%, O₂ - 10 %.

2.2.2. Трансфекция эмбриональных стволовых клеток мыши.

Не менее чем за 30 минут до трансфекции заменяли среду на ОПТИ-МЕМ (Gibco, США) с цитокином Lif (1:5000) по 170 мкл на лунку. В качестве трансфецирующего агента использовали полиэтиленимин (PEI). Трансфекционные смеси были приготовлены по следующей схеме: в пробирке смешивали 123 мкл ОПТИ-МЕМ + Lif и 22,5 мкл плазмиды (750 нг на лунку) после чего содержимое тщательно перемешивали. Затем, не касаясь стенок пробирки, добавляли 4,5 мкл полиэтиленимина (PEI) (1 мг/мл) и снова хорошо перемешивали. Соотношение ДНК:PEI составляло 1:2. Полученную смесь оставляли на 15 минут при комнатной температуре. Затем, смесь по каплям добавляли в среду культивируемых клеток.

Через 1 час после трансфекции добавляли 170 мкл среды ОПТИ-МЕМ + Lif. На следующий день добавляли еще по 300 мкл среды KnockOut DMEM+ Lif. За 1 день до фиксации, производили пересев клеток. Для этого отбирали пипеткой среду и добавляли нагретый до 37° С 0.25% трипсин, инкубировали 10 мин в термостате при 37° С. Затем добавляли среду DMEM с фактором Lif (1:5000), суспендировали и пересеивали в подготовленные планшеты. На следующий день клетки фиксировали. Для этого аспирировали среду, промывали PBS, затем добавляли 200 мкл 4 % формалина и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. После чего промывали лунки с фиксированными клетками с помощью 1X PBS, планшеты хранили при 4° С до использования.

2.2.3. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток.

Фиксированные в планшетах клетки пермеабелизировали инкубацией в 0,5 % растворе Triton X - 100 приготовленном на PBS, в течении 15 мин. Блокировку неспецифических сайтов связывания проводили в 3 % растворе BSA (бычий сывороточный

альбумин) приготовленном на PBS с добавлением детергента 0,1 % Tween-20 в течении 50 минут при комнатной температуре. Первые антитела (моноклональные rabbit anti-Oct-4, NCB1602, 1:400; моноклональные mouse anti-T7 NG69522, 1:1000; rabbit anti-PCBP2, ab96169, 1:500) на исследуемые белки разводили в блокировочном растворе и инкубировали с образцами в течении ночи при 4°С . После этого препараты промывали 2 раза раствором PBST (добавлен 0,1 % Tween). Затем образцы инкубировали 2 часа при комнатной температуре в блокировочном буфере со вторыми антителами, конъюгированными с флуорохромами (поликлональные goat anti-Rabbit IgG JackSonIR111165144; поликлональные sheep anti-Mouse IgG JackSon515605003), отмывали 2 раза в 0.1% Tween-20-PBS. Затем окрашивали ядра раствором DAPI (Sigma, Германия) концентрация которого составляла 1 мкг/мл, разведенным с помощью PBS. Для сохранности образцы заливали 1 мл PBS с добавлением азиды натрия в конечной доле 0,002%. Препараты были визуализированы при помощи флуоресцентного микроскопа (Evos FL Auto).

2.2.4. Измерение интенсивности флуоресценции клеток.

Подсчет иммунофлуоресцентного сигнала окрашенных клеток в разных оптических каналах осуществляли при помощи программы ImageJ. Цифровые показатели сигнала, показывали среднее значение серого цвета в выбранной области снимка в условных единицах (arbitrary units, IAU).

2.2.5. Статистические методы.

Цифровые значения анализировали непараметрическим U-критерием Манна-Уитни в программе Statistica. Гистограммы строили в программе Origin.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Получение CRISPR/Cas9-плазмиды для нокаута гена *PCBP2* в ЭС клетках мыши.

Плазмиды нарабатывали в *E. coli* штамм HB101, после чего их изолировали и очищали. На рис.5 представлен электрофорез образцов. Во всех шести образцах нет примесей РНК, содержатся только единичные варианты плазмидной ДНК. Секвенирование, проведенное в компании Евроген, подтвердило наличие вставки, кодирующей РНК-гид РСВР2 в ожидаемый сайт Bbs1 (рис. 6). Олигонуклеотдная вставка комплементарна части последовательности ДНК гена интереса. РНК-гид, кодируемый вставкой, ассоциирован с ДНКазой Cas9, которая разрезает целевой ген, что приводит к его нокауту. Cas9 также продуцируется плазмидой. В эксперименте ожидалось, что уровень белка РСВР2 будет снижен. В мышинных ЭС клетках при трансфекции с полиэтиленимином полученными плазмидами, наблюдалась продукция маркерного гена GFP, вместе со снижением уровня РСВР2 (рис. 7). Таким образом плазида работает и может быть использована в дальнейшем эксперименте.

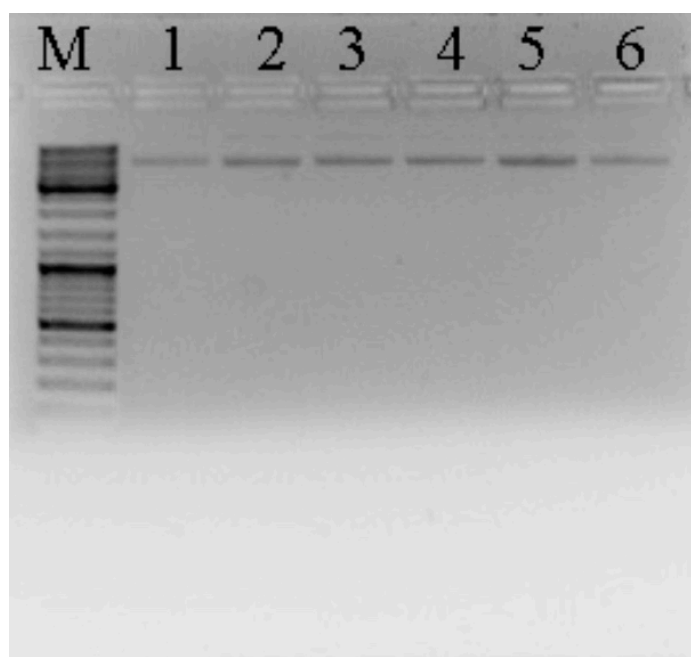


Рис. 5 Электрофорез в агарозном геле. М- маркер, 1-6 - образцы плазмидной ДНК.

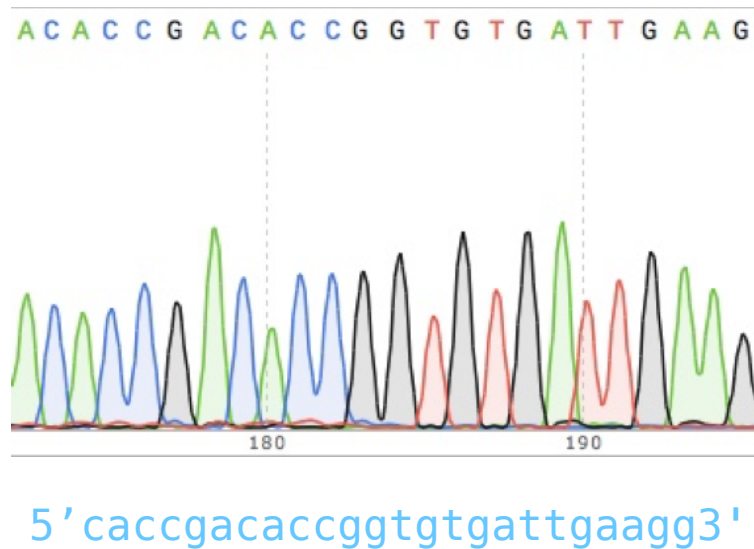


Рис. 6. Последовательность вставки, кодирующей РНК-гид PCBP2 в сайт Bbs1. (Построено в SnapGene Viewer).

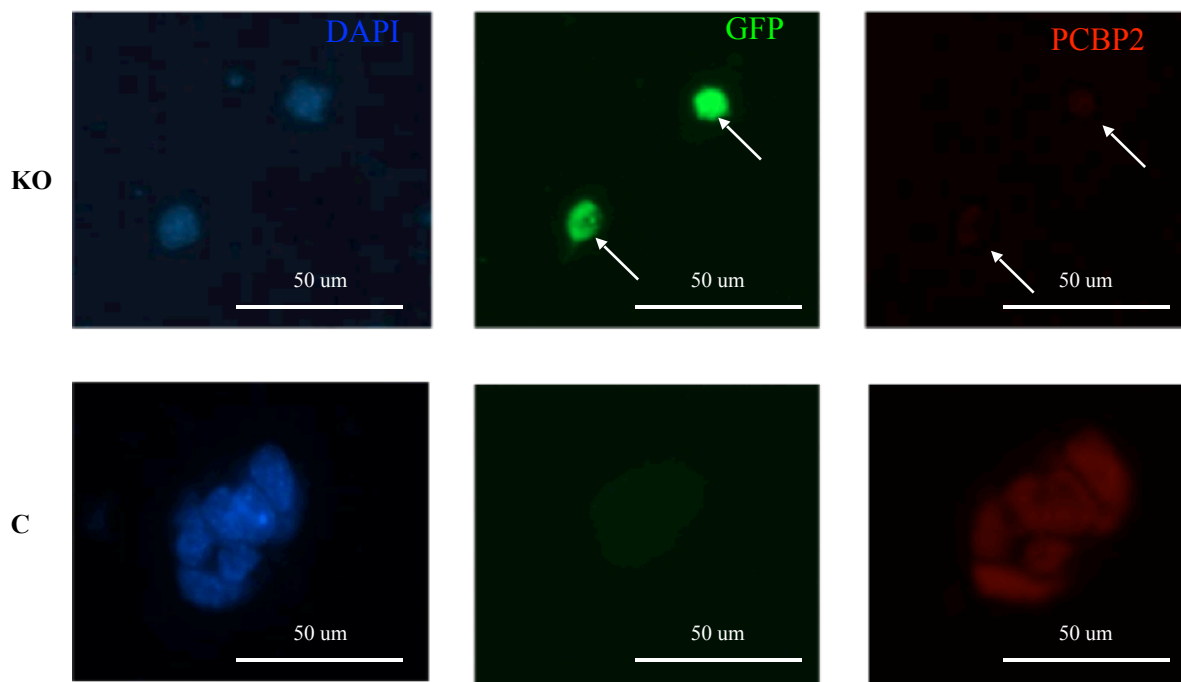


Рис. 7. Нокаут *PCBP2* в стволовых клетках мыши. а. КО-нокаут, С-контроль; GFP - маркерный белок плазмиды CRISPR, PCBP2 – окраска антителами к PCBP2, Ув. 400х

3.2. Трансфекция оверэкспрессирующими и нокаутными плазмидами ЭС клеток и их окраска на исследуемые белки с помощью методов иммуноцитохимии.

В ходе эксперимента мышинные эмбриональные стволовые клетки были трансфицированы оверэкспрессирующими плазмидами (LVTHM-T7-hnRNP K, LVTHM-T7-PCBP1, LVTHM-T7-PCBP2) и плазмидами для нокаута (pX330-KO-PCBP1, pX330-KO-PCBP2). Все плазмиды, кроме pX330-KO-PCBP2, имелись в наличии в лаборатории; задачей автора настоящей работы стало изготовление недостающей плазмиды.

Оверэкспрессирующие плазмиды имели последовательность, кодирующую T7 тег (рис.8), слитую с экспрессируемым геном интереса. T7 тег представляет собой пептид из 11 аминокислот, полученный из основного белка капсида бактериофага T7. Эпитопы тега обеспечивают возможность локализации белков с их низким содержанием либо при отсутствии специфических антител у исследователя. Нокаутные плазмиды экспрессировали GFP.

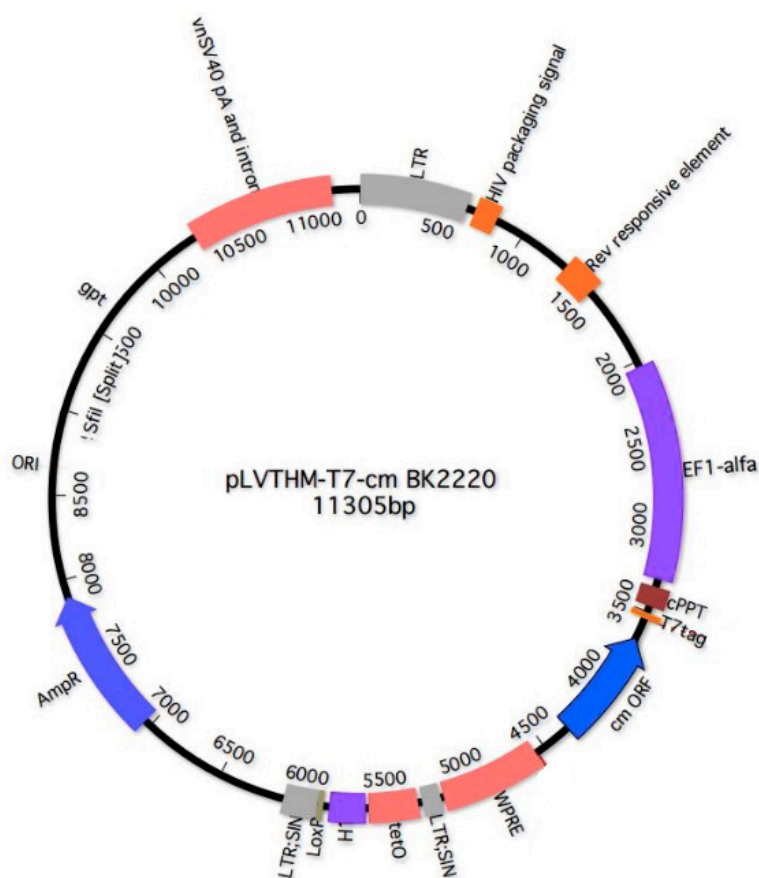


Рис. 8. Пример плазмиды кодирующей T7 тег. (из Некрасов, 2015)

Через 48 часов после трансфекции клетки были зафиксированы и окрашены антителами к T7 тегу, белку Oost-4.

3.2.1. Сверхпродукция поли(С)-связывающих белков и продукция Oost-4.

На микрофотографиях (рис. 8) представлены результаты иммуноцитохимического окрашивания ЭС клеток мыши. Во всех случаях очевидной корреляции между сверхэкспрессией белков hnRNP К, PCBP1, PCBP2 и Oost-4 не наблюдалось. Так, на рис.9 представлены различные уровни продукции поли(С)-связывающих белков, однако не отмечается заметного колебания уровня Oost-4.

3.2.2. Нокаут генов, кодирующих поли(С)-связывающие белки и продукция Oost-4.

На микрофотографиях (рис.10) представлены результаты иммуноцитохимического окрашивания ЭС клеток мыши. В клетках с нокаутом *PCBP1* отмечалось понижение уровня продукции белка Oost-4 (рис. 10.1). В двух других случаях четко взаимосвязи между снижением продукции каждого из белка интереса с уровнем продукции Oost-4 выявить не удалось. На (рис. 10.2) нокаут *PCBP2* не сопровождается изменением в окрашивании белка Oost-4. На (рис. 10.3) клетки с нокаутом hnRNP К имеют сниженный уровень продукции Oost-4, однако такое падение уровня Oost-4 отмечается и в клетках без нокаута.

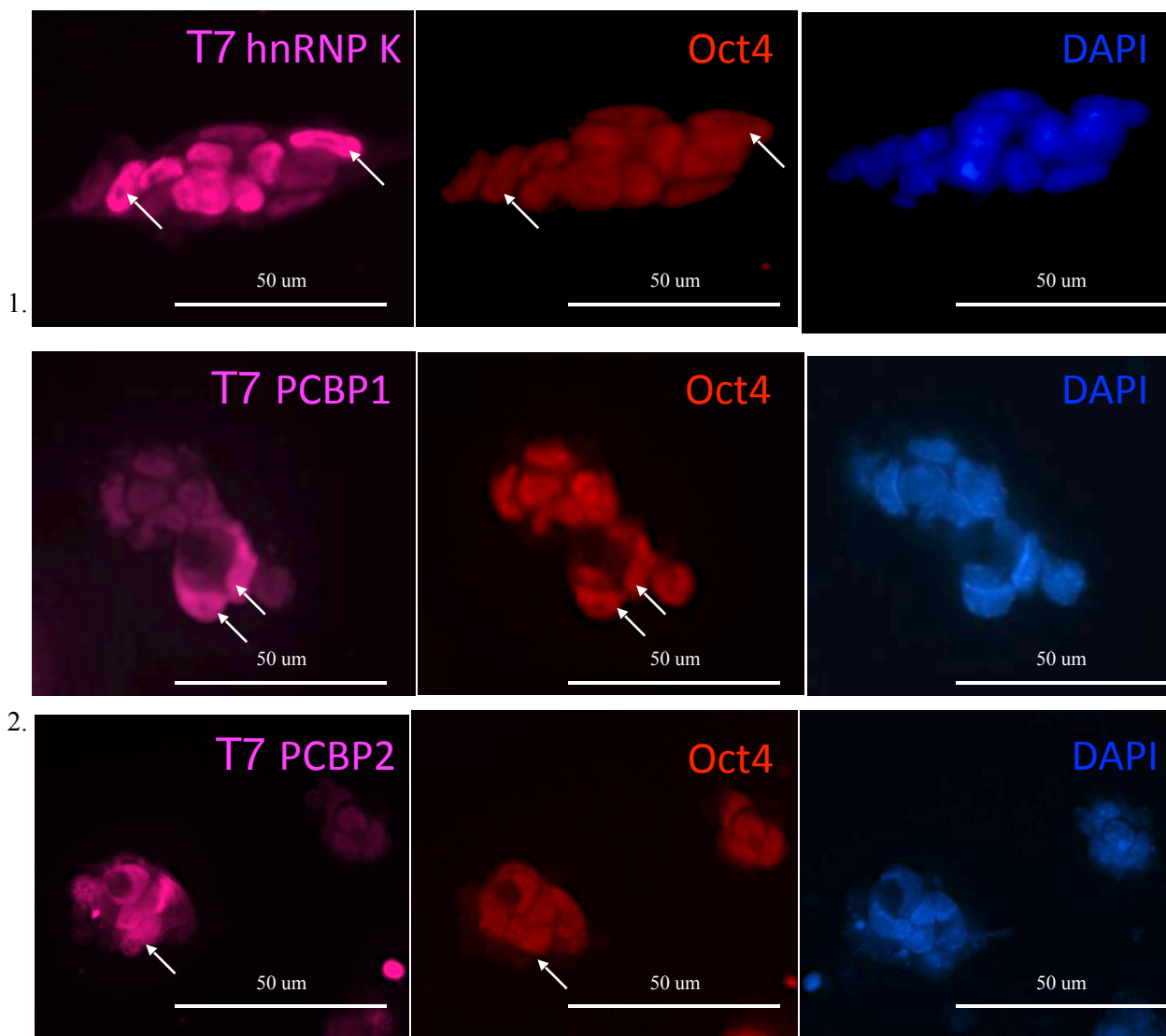


Рис. 9. Результаты окрашивания ЭС клеток мыши АТ к Т7 тегу hnRNP K, PCBP1, PCBP2 и к белку Oct4. Стрелками указаны примеры сверхпродукции белков и ее влияния на продукцию Oct4.

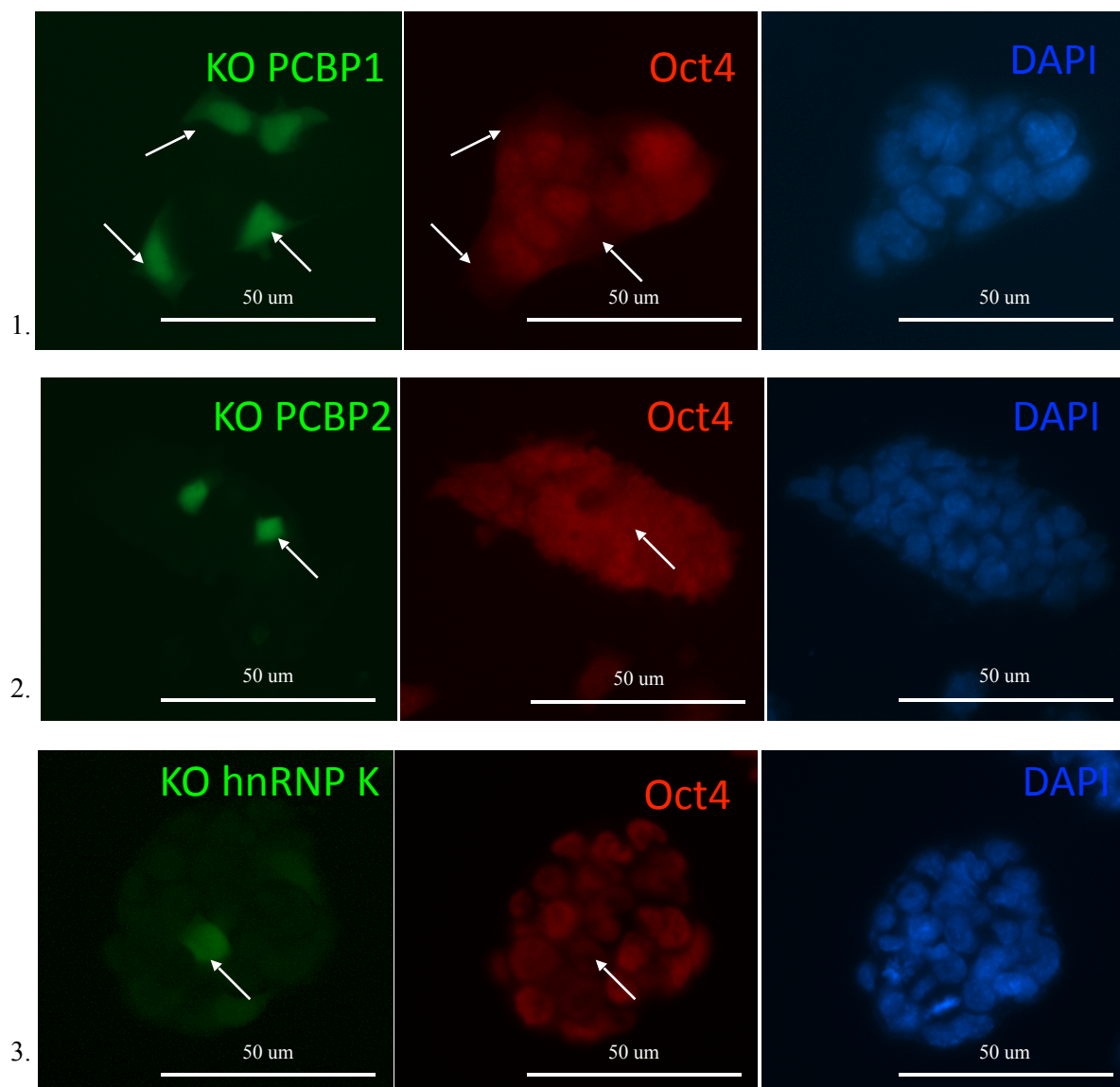


Рис. 10. Результаты окрашивания ЭС клеток мыши АТ к белку Oct4. GFP-маркерный белок продуцируемый в нокаутированных клетках. Стрелками указаны примеры снижения синтеза белков и его влияния на продукцию Oct4. Ув. 400^x

3.3. Сравнение уровней продукции поли(С)-связывающих белков с уровнем продукции Oct-4.

3.3.1 Влияние сверхпродукции hnRNP K, PCBP1, PCBP2 на уровень продукции Oct-4.

Трансфецированные клетки идентифицировали по наличию иммунофлуоресцентного сигнала T7 тега. На рис. 11 показаны стрелками пороговые значения для клеток с прошедшей оверэкспрессией. Различия в уровне экспрессии T7-позитивных от контрольных клеток достоверны ($p < 0,05$). Сравнения числовых данных контроля и оверэкспрессии проводили непараметрическим U-критерием Манна-Уитни. Анализ выборок (рис. 12), показал, что распределение интенсивности окрашивания Oct-4 в трансфецированных и контрольных клетках не отличалось статистической значимостью ($p > 0,05$).

3.3.2 Влияние нокаута PCBP1, PCBP2 на продукцию Oct-4.

Трансфецированные клетки идентифицировали по маркерному белку GFP плазмиды CRISPR, который синтезировался в нокаутных клетках. На рис. 13 стрелками указан выбранный порог отсека нетрансфецированных (неспецифическая флуоресценция) клеток от клеток с экспрессированной плазмидой. Сравнения выборок из контроля и нокаута проводили непараметрическим U-критерием Манна-Уитни. Различия в уровне экспрессии GFP-позитивных от контрольных клеток статистически достоверны ($p < 0,05$).

Сравнение двух выборок (рис. 14) показало, что при нокауте PCBP1 интенсивность иммунофлуоресценции Oct-4 соответствующих клеток статистически значимо снизилась ($p < 0,05$).

При нокауте PCBP2 отличий от контрольной выборки в колебании уровня Oct-4 не обнаружено ($p > 0,05$).

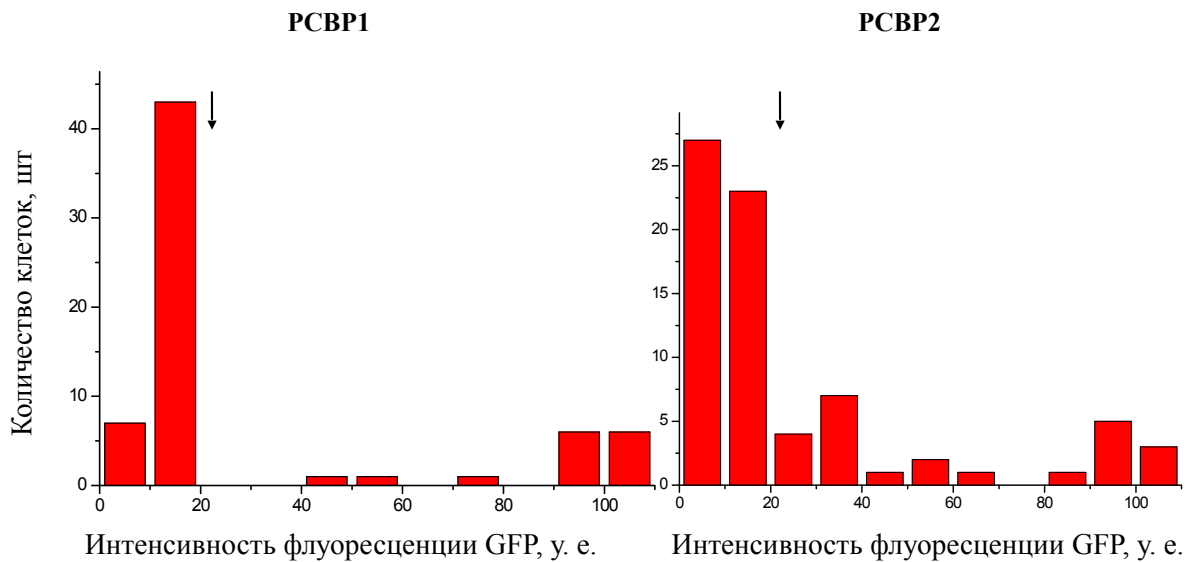


Рис.13. Гистограммы распределения количества клеток в зависимости от интенсивности иммунофлуоресценции маркерного белка GFP в нокаутированных по *PCBP1*, *PCBP2* клетках. Стрелками указан порог отсеечения клеток с экспрессией маркерного гена CRISPR-плазмиды.

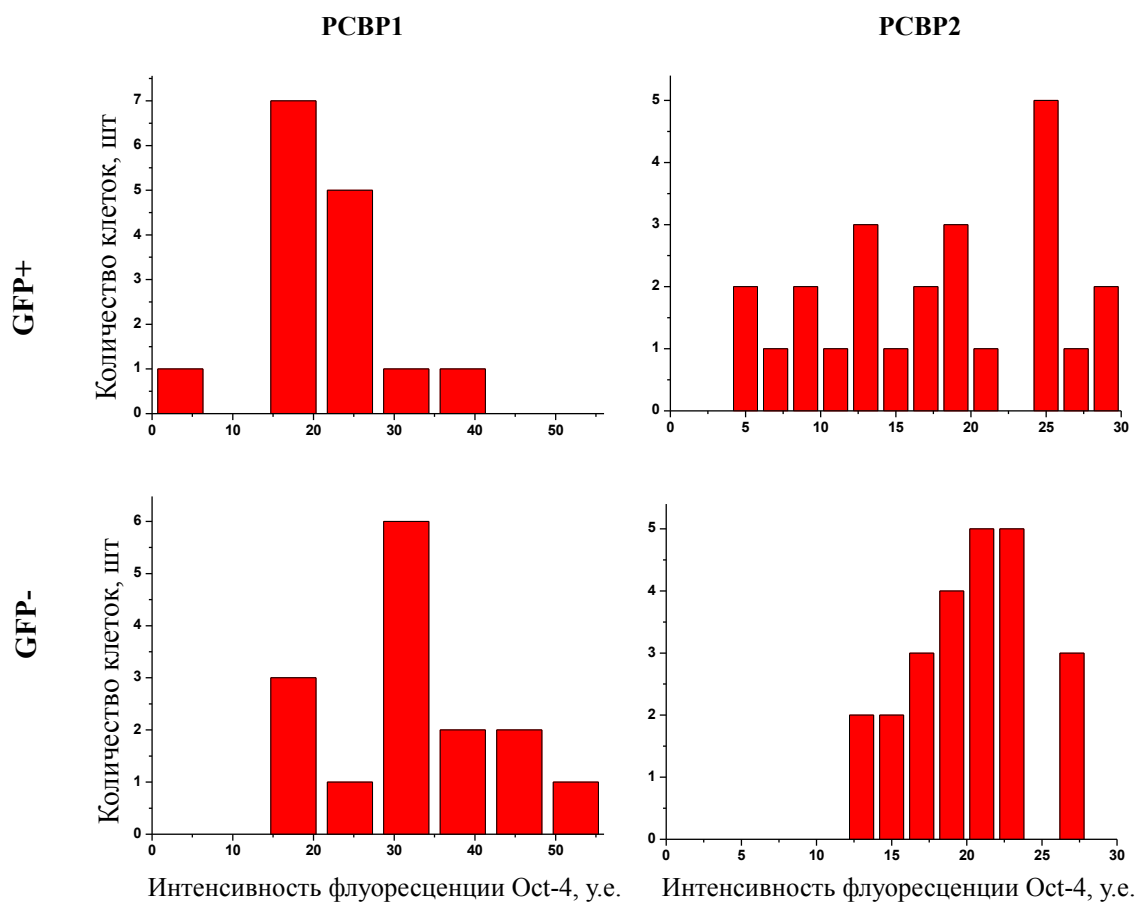


Рис.14. Влияние нокаута *PCBP1*, *PCBP2* на продукцию белка Oct4. Гистограммы показывают распределение количества клеток в зависимости от степени продукции Oct4 в контроле (GFP-) и при нокауте (GFP+). По оси абсцисс представлена интенсивность иммунофлуоресценции, по оси ординат количество клеток.

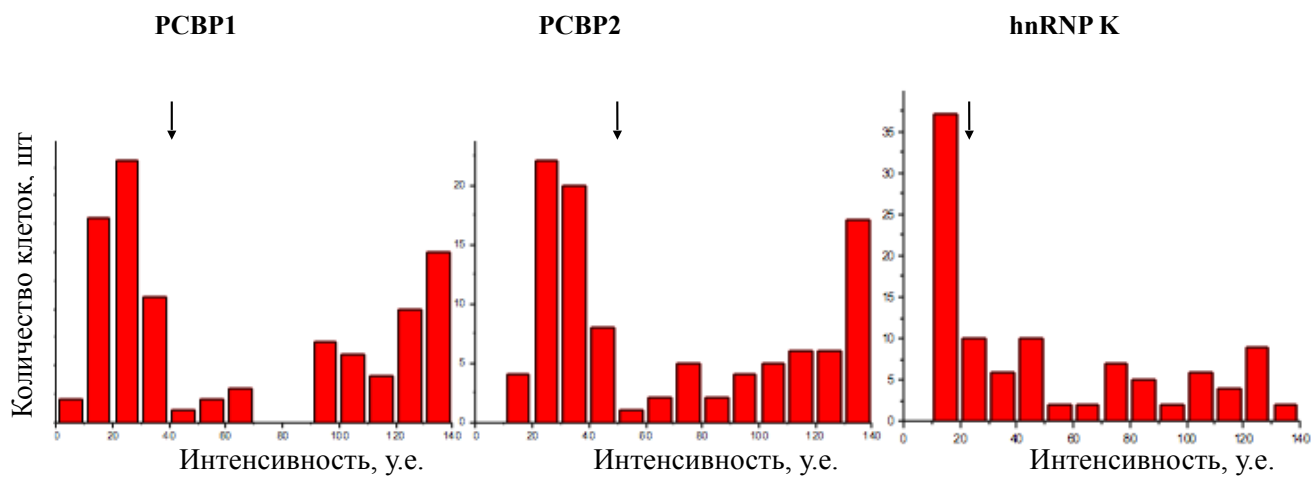


Рис. 11. Гистограммы распределения количества клеток в зависимости от интенсивности иммунофлуоресценции T7 тега hnRNP K, PCBP1, PCBP2. Стрелками указан порог отсеечения клеток с гиперэкспрессией.

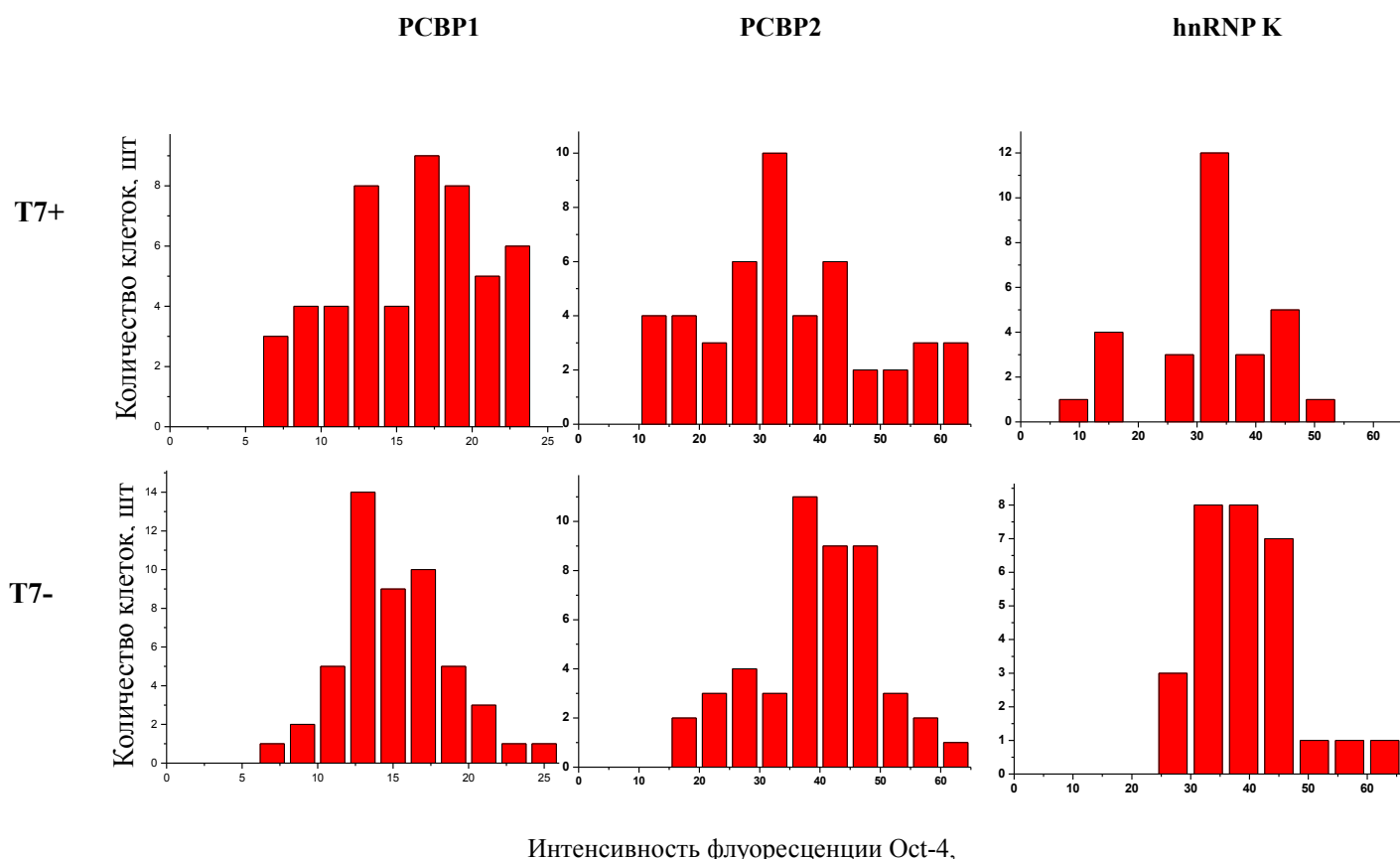


Рис. 12. Влияние гиперэкспрессии PCBP1, PCBP2 и hnRNP K на продукцию белка Oct-4. Гистограммы показывают распределение количества клеток в зависимости от интенсивности иммунофлуоресцентного сигнала Oct-4.

Таким образом, PCBP1 предположительно может влиять на продукцию белка Oct-4. В подтверждение этого факта показано, что нокдаун PCBP1 эмбриона мыши влиял на ее эмбриональное развитие, важнейшим регулятором которого является Oct-4 (Ghanem et al. 2015).

Настоящая работа является частью проводимого в лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток ИИЦ РАН исследования по изучению участия поли(С)-связывающих белков в регуляции гена *Oct-4*. Фактор транскрипции Oct-4 является важнейшим белком для эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (Kim et al., 2009; Wu, Scholer 2014). Показано, что снижение экспрессии Oct-4 индуцирует дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток. Ген Oct-4 регулируется очень тонко, так как уменьшение или увеличение его экспрессии наполовину приводит к потере плюрипотентности. Ген *Oct-4* контролируется проксимальным энхансером, дистальным энхансером и проксимальным промотором. Эти последовательности ДНК подвержены сильной эпигенетической супрессии в дифференцированных клетках, где *Oct-4* не экспрессируется, но в начале транскрипции *Oct-4* эти последовательности становятся мишенями для связывания регуляторных белков. На преимплантационной стадии развития эмбриона, а также в культивируемых эмбриональных стволовых клетках мыши ключевую роль играет дистальный энхансер, необходимый для экспрессии Oct-4 во внутренней клеточной массе бластулы и культивируемых эмбриональных стволовых клетках, содержит два элемента - сайты 2А и 2В (Бахмет и др., 2017). С сайтом 2В связывается кластер белков Oct-4 - Sox2 (Okumura-Nakanishi et al., 2005). Okumura-Nakanishi с коллегами продемонстрировали, что неизвестные белки, связывающиеся с сайтом 2А дистального энхансера гена Oct-4, присутствуют не только в эмбриональных стволовых клетках, но и в дифференцированных фибробластах (рис. 15А). В нашей лаборатории эксперименты показали, что в клетках мозга, тимуса, с сайтом 2А гена Oct-4 также связываются неизвестные белки (рис. 15Б). Белки выделили и идентифицировали при помощи метода масс-спектрометрии, аффинной хроматографии, гель-ретардации. Анализ показал, что они представляли собой, собственно, несколько представителей семейства поли(С)-связывающих белков PCBP1, PCBP2, PCBP3, hnRNPК, (Рис. 16). Кроме того, исследования выявили, что при нокдауне hnRNPК, снижается экспрессия таких плюрипотентных маркеров, как Oct-4, Nanog (Бахмет и др., 2017). Однако другие исследователи показали, что при нокдауне hnRNPК экспрессия *Oct-4* была повышена (Lin et al.. 2014).

В дальнейшем потребовалось подтвердить полученные данные экспериментами *in*

in vivo. Ранние исследования влияние нокаута *hnRNPК* и *PCBP1* на экспрессию *Oct-4* на эмбриональных стволовых клетках мыши показали, что при снижении уровня экспрессии *hnRNPК*, через 4 дня понижался уровень экспрессии *Oct-4*. При длительном культивировании нокаут приводил к гибели клеток (Бахмет и др., 2017). При этом, нокаут *PCBP1* не влиял на экспрессию *Oct-4* и на жизнеспособность клеток, что противоречило существующим в литературе данным, о решающем значении уровня экспрессии *PCBP1* во время эмбрионального развития (Ghanem et al. 2015).

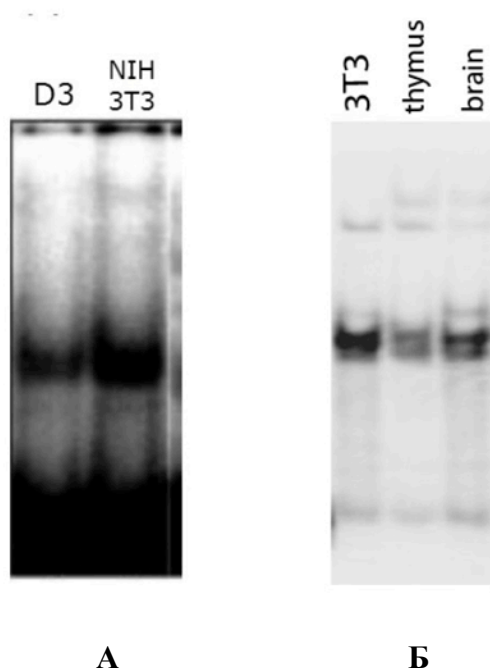


Рис. 15. Результаты гель-ретардации.

А - неизвестные белки, взаимодействуют с НК сайта 2А (образцы белков из эмбриональных стволовых клеток D3, и из фибробластов NIH 3Т3). Б – последовательность НК сайта 2А связывается с исследуемыми белками (образцы белков из 3Т3 NIH, тимуса, мозга). Белки идентифицированы как принадлежащие группе поли(С)-связывающих белков. (А - Okumura-Nakanishi et al., 2005; Б - Бахмет и др., 2017)

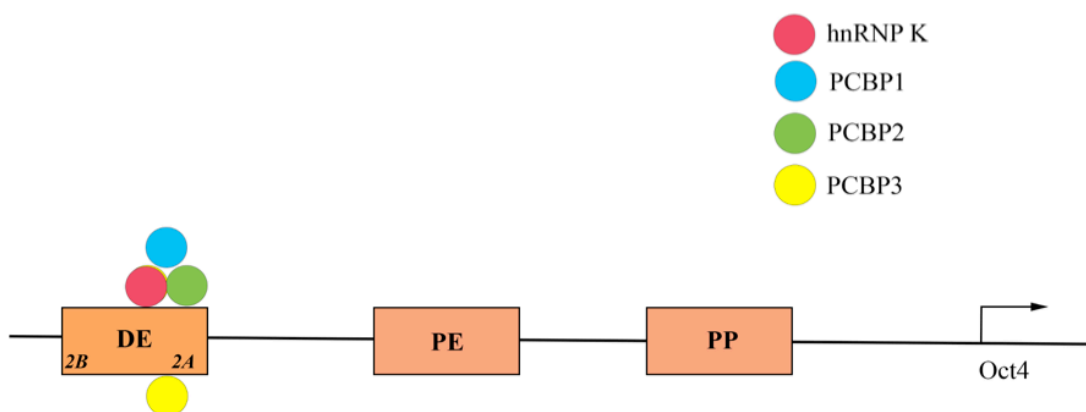


Рис.16. Ген *Oct-4* регулируется поли(С)-связывающими белками.

Обозначения: дистальный энхансер (DE), проксимальный энхансер (PE), проксимальный промотор (PP), 2А и 2В - сайты энхансера.

Ранее в лаборатории получены оверэкспрессирующие плазмиды LVTHM-T7-hnRNP K, LVTHM-T7-PCBP1, LVTHM-T7-PCBP2 и плаزمида для нокаута рХ330-КО-PCBP1 которые использовались в экспериментах в настоящей работе. Необходимо было доказать возможность создания плазмиды для нокаута *PCBP2*. В дальнейшем плазмиду использовали в экспериментах представленных на рис. 9 и рис. 10.

Настоящая работа восполняет отсутствие сводных данных о влиянии сверхпродукции hnRNPК, PCBP1, PCBP2 и нокаута *PCBP1*, *PCBP2* на продукцию белка Oct-4. Исследование показывает, что повышенный уровень продукции hnRNP K, PCBP1, PCBP2, как и нокаут *PCBP2* не влияет на синтез Oct-4. Однако нокаут *PCBP1* уменьшает продукцию Oct-4.

ВЫВОДЫ.

1. Полученная CRISPR/Cas9-плазмида снижает уровень продукции *PCBP2*.
2. После трансфекции оверэкспрессирующими плазмидами (LVTHM-T7-hnRNPК, LVTHM-T7-PCBP1, LVTHM-T7-PCBP2) значительных изменений уровня продукции *Ost-4* не установлено.
3. При нокауте *PCBP2* с использованием CRISPR/Cas9-плазмиды рХ330-КО-PCBP2 не изменялся уровень продукции белка *Ost-4*.
4. После нокаута *PCBP1* с использованием CRISPR/Cas9-плазмиды рХ330-КО-PCBP1 понижался уровень продукции белка *Ost-4*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Бахмет Е.И., Назаров И.Б., Кузьмин А.А., Синенко С.А., Артамонова Т.О., Ходорковский М.А., Томилин А.Н. Роль hnnp-k в регуляции экспрессии ост-4 // Гены и клетки. 2017. 12(3): 40.
2. Berry A.M., Flock K.E., Loh H.H., Ko J.L. Molecular basis of cellular localization of poly C binding protein 1 in neuronal cells // Biochem Biophys Res Commun. 2006. 349(4): 1378-1386.
3. Blanchette A.R., Fuentes Medel Y.F., Gardner P.D.. Cell-type-specific and developmental regulation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K mRNA in the rat nervous system // Gene Expr Patterns. 2006. 6(6): 596-606.
4. Bomsztyk K., Denisenko O., Ostrowski J. hnRNP K: one protein multiple processes // Bioessays. 2004. 26(6): 629-38.
5. Chen Q., Jin M., Zhu J., Xiao Q., Zhang L. Functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in stem cell potency and differentiation // Biomed Res Int. 2013. 2013: 623978.
6. Chen Y., Zhou X., Liu N., Wang C., Zhang L., Mo W., Hu G. Arginine methylation of hnRNP K enhances p53 transcriptional activity // FEBS Lett. 2008. 582(12): 1761-1765.
7. Chiou Y.Y., Lin W.J., Fu S.L., Lin C.H. Direct mass-spectrometric identification of Arg296 and Arg299 as the methylation sites of hnRNP K protein formethyltransferase PRMT1 // Protein J. 2007. 26(2): 87-93.
8. Chkheidze A.N., Liebhaber S.A. A novel set of nuclear localization signals determine distributions of the alphaCP RNA-binding proteins // Mol Cell Biol. 2003. 23(23): 8405-8415.
9. Choi H.S., Hwang C.K., Song K.Y., Law P.Y., Wei L.N., Loh H.H. Poly(C)-binding proteins as transcriptional regulators of gene expression // Biochem Biophys Res Commun. 2009. 380: 431-436.

10. Choi H.S., Song K.Y., Hwang C.K., Kim C.S., Law P.Y., Wei L.N., Loh H.H. A proteomics approach for identification of single strand DNA-binding proteins involved in transcriptional regulation of mouse mu opioid receptor gene // *Mol Cell Proteomics*. 2008. 7(8): 1517-1529.
11. Da Silva N., Bharti A., Shelley C.S. hnRNP-K and Pur(alpha) act together to repress the transcriptional activity of the CD43 gene promoter // *Blood*. 2002. 100(10): 3536-3544.
12. Dejgaard K., Leffers H., Rasmussen H.H., Madsen P., Kruse T.A., Gesser B., Nielsen H., Celis J.E. Identification, molecular cloning, expression and chromosome mapping of a family of transformation upregulated hnRNP-K proteins derived by alternative splicing // *J Mol Biol*. 1994. 236(1): 33-48.
13. Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // *Nature*. 1981. 292: 154–156.
14. Fan X., Xiong H., Wei J., Gao X., Feng Y., Liu X., Zhang G., He Q.Y., Xu J., Liu L. Cytoplasmic hnRNPK interacts with GSK3 β and is essential for the osteoclast differentiation // *Sci Rep*. 2015. 5: 17732.
15. Gallardo M., Hornbaker M.J., Zhang X., Hu P., Bueso-Ramos C., Post S.M. Aberrant hnRNP K expression: All roads lead to cancer // *Cell Cycle*. 2016. 15(12): 1552-1557.
16. Gallardo M., Lee H.J., Zhang X., Bueso-Ramos C., Paeon L.R., McArthur M., Multani A., Nazha A., Manshoury T., Parker-Thornburg J., Rapado I., Quintas-Cardama A., Kornblau S.M., Martinez-Lopez J., Post S.M. hnRNP K Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor that Regulates Proliferation and Differentiation Programs in Hematologic Malignancies // *Cancer Cell*. 2015. 28(4): 486-499.
17. Gamarnik A.V., Andino R. Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5' noncoding region of poliovirus RNA // *RNA*. 1997. 3(8): 882-892.
18. Geuens T., Bouhy D., Timmerman V. The hnRNP family: insights into their role in health and disease // *Hum Genet*. 2016. 135(8): 851-867.
19. Geuens T., Bouhy D., Timmerman V. The hnRNP family: insights into their role in health and disease // *Hum Genet*. 2016. 135(8): 851-67.

20. Ghanem L.R., Kromer A., Silverman I.M., Chatterji P., Traxler E., Penzo-Mendez A., Weiss M.J., Stanger B.Z., Liebhaber S.A. The Poly(C) Binding Protein Pcbp2 and Its Retrotransposed Derivative Pcbp1 Are Independently Essential to Mouse Development // *Mol Cell Biol.* 2015. 36(2): 304- 319.
21. Gibson T.J., Thompson J.D., Heringa J. The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binding to nucleic acid // *FEBS Lett.* 1993. 324: 361–366.
22. Habelhah H., Shah K., Huang L., Ostareck-Lederer A., Burlingame A.L., Shokat K.M., Hentze M.W., Ronai Z. ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation // *Nat Cell Biol.* 2001. 3(3): 325- 330.
23. Hadian K., Vincendeau M., Mäusbacher N., Nagel D., Hauck S.M., Ueffing M., Loyter A., Werner T., Wolff H., Brack-Werner R. Identification of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-recognition region in the HIV Rev protein // *J Biol Chem.* 2009. 284(48): 33384-33391.
24. Kim J.B., Sebastiano V., Wu G., Araúzo-Bravo M.J., Sasse P., Gentile L., Ko K., Ruau D., Ehrich M., van den Boom D., Meyer J., Hübner K., Bernemann C., Ortmeier C., Zenke M., Fleischmann B.K., Zaehres H., Schöler H.R. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells // *Cell.* 2009. 136(3): 411-419.
25. Kühn H., Heydeck D., Brinckman R., Trebus F. Regulation of cellular 15-lipoxygenase activity on pretranslational, translational, and posttranslational levels // *Lipids.* 1999. 34 Suppl: S273-279.
26. Lau J.S., Baumeister P., Kim E., Roy B., Hsieh T.Y., Lai M., Lee A.S. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as regulators of gene expression through interactions with the human thymidine kinase promoter // *J Cell Biochem.* 2000. 79(3): 395-406.
27. Li Y., Lin L., Li Z., Ye X., Xiong K., Aryal B., Xu Z., Paroo Z., Liu Q., He C., Jin P. Iron homeostasis regulates the activity of the microRNA pathway through poly(C)-binding protein 2 // *Cell Metab.* 2012. 15(6): 895-904.

28. Lian W.X., Yin R.H., Kong X.Z., Zhang T., Huang X.H., Zheng W.W., Yang Y., Zhan Y.Q., Xu W.X., Yu M., Ge C.H., Guo J.T., Li C.Y., Yang X.M. THAP11, a novel binding protein of PCBP1, negatively regulates CD44 alternative splicing and cell invasion in a human hepatoma cell line // *FEBS Lett.* 2012. 586(10):1431-1438.
29. Lin N., Chang K.Y., Li Z., Gates K., Rana Z.A., Dang J., Zhang D., Han T., Yang C.S., Cunningham T.J., Head S.R., Duyster G., Dong P.D., Rana T.M. An evolutionarily conserved long noncoding RNA TUNA controls pluripotency and neural lineage commitment // *Mol Cell.* 2014. 53(6): 1005- 1019.
30. Liu Y., Gervasi C., Szaro B.G. A crucial role for hnRNP K in axon development in *Xenopus laevis*. *Development.* 2008. 135(18): 3125-3135.
31. Makeyev A.V., Liebhaber S.A. Identification of two novel mammalian genes establishes a subfamily of KH-domain RNA-binding proteins // *Genomics.* 2000. 67: 301–316.
32. Malik A.K., Flock K.E., Godavarthi C.L., Loh H.H., Ko J.L. Molecular basis underlying the poly C binding protein 1 as a regulator of the proximal promoter of mouse mu-opioid receptor gene // *Brain Res.* 2006. 1112(1): 33-45.
33. Meng Q., Rayala S.K., Gururaj A.E., Talukder A.H., O'Malley B.W., Kumar R. Signaling-dependent and coordinated regulation of transcription, splicing, and translation resides in a single coregulator, PCBP1 // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007. 104(14): 5866-5871.
34. Michelotti E.F., Michelotti G.A., Aronsohn A.I., Levens D. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor // *Mol Cell Biol.* 1996. 16(5): 2350-2360.
35. Okumura-Nakanishi S., Saito M., Niwa H., Ishikawa F. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells // *J Biol Chem.* 2005. 280(7):5307-5317.
36. Ostareck-Lederer A., Ostareck D.H., Rucknagel K.P., Schierhorn A., Moritz B., Huttelmaier S., Flach N., Handoko L., Wahle E. Asymmetric arginine dimethylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein-arginine methyltransferase 1 inhibits its interaction with c-Src // *J Biol Chem.* 2006. 281(16): 11115-11125.

37. Philpott C.C., Ryu M.S., Frey A., Patel S. Cytosolic iron chaperones: Proteins delivering iron cofactors in the cytosol of mammalian cells // *J Biol Chem.* 2017. 292(31): 12764-12771.
38. Pickering B.M., Mitchell S.A., Spriggs K.A., Stoneley M., Willis A.E. Bag-1 internal ribosome entry segment activity is promoted by structural changes mediated by poly(rC) binding protein 1 and recruitment of polypyrimidine tract binding protein 1 // *Mol Cell Biol.* 2004. 24(12): 5595-605.
39. Schullery D.S., Ostrowski J., Denisenko O.N., Stempka L., Shnyreva M., Suzuki H., Gschwendt M., Bomszyk K. Regulated interaction of protein kinase Cdelta with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein // *J Biol Chem.* 1999. 274(21): 15101-15101.
40. Schullery D.S., Ostrowski J., Denisenko O.N., Stempka L., Shnyreva M., Suzuki H., Gschwendt M., Bomszyk K. Regulated interaction of protein kinase Cdelta with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein // *J Biol Chem.* 1999. 274(21): 15101-15109.
41. Thisted T, Lyakhov D.L., Liebhaber S.A. Optimized RNA targets of two closely related triple KH domain proteins, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and alphaCP-2KL, suggest Distinct modes of RNA recognition // *J Biol Chem.* 2001. 276: 17484–17496.
42. Thompson P.J., Dulberg V., Moon K.M., Foster L.J., Chen C., Karimi M.M., Lorincz M.C. hnRNP K coordinates transcriptional silencing by SETDB1 in embryonic stem cells // *PLoS Genet.* 2015. 11(1): e1004933.
43. Tommerup N., Leffers H. Assignment of human KH-box-containing genes by in situ hybridization: HNRNPK maps to 9q21.32-q21.33, PCBP1 to 2p12-p13, and PCBP2 to 12q13.12-q13.13, distal to FRA12A // *Genomics.* 1996. 32: 297–298.
44. Valverde R., Edwards L., Regan, L. Structure and function of KH domains // *FEBS J.* 2008. 275: 2712–2726.
45. Van Seuning I., Ostrowski J., Bustelo X.R., Sleath P.R., Bomszyk K. The K protein domain that recruits the interleukin 1-responsive K protein kinase lies adjacent to a cluster

- of c-Src and Vav SH3-binding sites. Implications that K protein acts as a docking platform // J Biol Chem. 1995. 270(45): 26976-26985.
46. Wu G., Schöler H.R. Role of Oct4 in the early embryo development // Cell Regen (Lond). 2014. 3(1): 7.
47. Xia M., He H., Wang Y., Liu M., Zhou T., Lin M., Zhou Z., Huo R., Zhou Q., Sha J. PCBP1 is required for maintenance of the transcriptionally silent state in fully grown mouse oocytes // Cell Cycle. 2012. 11(15): 2833-2842.