

УДК 577.218

КН-ДОМЕННЫЕ ПОЛИ(С)-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ КАК МНОГОСТОРОННИЕ РЕГУЛЯТОРЫ РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Обзор

© 2019 И.Б. Назаров*, Е.И. Бахмет, А.Н. Томили

*Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Россия;
электронная почта: i.nazarov@incras.ru*

Поступила в редакцию 16.10.2018

После доработки 10.11.2018

Принята к публикации 21.11.2018

Пять известных членов семейства КН-доменных поли(С)-связывающих белков (Pcbp1–4, hnRNP-K) имеют необычайно широкий спектр клеточных функций, включая регуляцию транскрипции генов, процессинг пре-мРНК, сплайсинг, стабильность мРНК, регуляцию на уровне трансляции белков, контроль обмена железа и многие другие. Механистически эти белки функционируют посредством связывания с нуклеиновыми кислотами и через белок-белковые взаимодействия. Вследствие способности выполнять многочисленные функции, члены семейства КН-доменных поли(С)-связывающих белков вовлечены в широкий спектр биологических процессов, таких как эмбриональное развитие, дифференцировка клеток и рак. Нарушения нормальной экспрессии КН-доменного белка часто связаны с серьезными дефектами развития и неоплазией. В данном обзоре обобщен прогресс в исследованиях КН-доменных белков, проведенных за последние два десятилетия. Также сообщается о нашей недавней работе, предполагающей участие КН-фактора Pcbp1 в контроле перехода от наивного к праймированному плюрипотентному состоянию.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Pcbp1–4, hnRNP-K, экспрессия гена, клеточный цикл, рак, эмбриональное развитие, плюрипотентные стволовые клетки.

DOI: 10.1134/S0320972519030035

Домен гомологии hnRNP-K (КН) был впервые идентифицирован в гетерогенном ядерном рибонуклеопротеине К (hnRNP-K) ~25 лет назад [1]. Мотив КН-домена состоит из ~70 аминокислот и обнаруживается в разнообразных белках архей, бактерий и эукариот [2]. У эукариот он распространен среди нескольких семейств белков, связывающих нуклеиновые кислоты, включая семейство поли(С)-связывающих белков. Семейство КН-доменных поли(С)-связывающих белков представлено пятью родствен-

ными многофункциональными белками: Pcbp1, Pcbp2, Pcbp3, Pcbp4 (Poly(C)-binding proteins) и hnRNP-K. Pcbp1–4 альтернативно называют α CP1–4 (α -complex proteins), а Pcbp1 и Pcbp2 также известны как hnRNP-E1 и hnRNP-E2 соответственно. Кроме того, мРНК этого семейства подвержена альтернативному сплайсингу, а белки – посттрансляционным модификациям, что увеличивает разнообразие этой белковой группы. Три члена КН-семейства: Pcbp1, Pcbp2 и hnRNP-K – экспрессируются в клетках разных

Принятые сокращения: hnRNP-K – гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин К; Pcbp1, Pcbp2, Pcbp3, Pcbp4 – поли(С)-связывающие белки (Poly(C)-binding proteins); КН-белки или КН-доменные белки – КН-доменные поли(С)-связывающие белки; MOR – μ -опиоидный рецептор; CD43 – кластер дифференцировки 43 или лейкосиалин (cluster of differentiation 43); CD44 – CD44-антиген или гликопротеин клеточной поверхности CD44; snRNP – малый ядерный рибонуклеопротеин; TNAP11 – TNAP-домен-содержащий белок 11; 3'-UTR – 3'-нетранслируемая область; POLH – ДНК-полимераза H; GPR56 – ассоциированный с G-белком рецептор 56; DICE – CU-богатый мотив (differentiation control element); EMT – эпителиально-мезенхимальный переход (epithelial-mesenchymal transition); IRES – сайт входа рибосомы; PRF – запрограммированный рибосомальный сдвиг рамки считывания (programmed ribosomal frameshifting); siРНК – малые интерферирующие РНК; HIF1 α – индуцируемый при гипоксии фактор α ; ESC – эмбриональные стволовые клетки (embryonic stem cells); mESC – эмбриональные стволовые клетки мыши; hESC – эмбриональные стволовые клетки человека; ChIP – иммунопреципитация хроматина; PLK1 – полоподобные киназы; p21 – белок-ингибитор циклин-зависимой киназы 1A (CDKN1A); p53 – опухолевый антиген p53; CDC27 – гомолог белка цикла клеточного деления 27; CDK2 – циклинзависимая киназа 2; miR – микроРНК; CRISPR/Cas9 – методика для направленного редактирования геномов (CRISPR – clustered regularly interspaced short palindromic repeats); PU.1 – гемопоэтический фактор транскрипции PU.1.

* Адресат для корреспонденции.

типов во время эмбрионального развития и у взрослых, тогда как экспрессия Pcbp3 и Pcbp4 значительно слабее, и эти белки менее изучены. Каждый белок содержит три КН-домена, которые совместно обеспечивают высокое сродство и специфичность взаимодействия с полипиримидиновыми или С-богатыми областями РНК, а также одноцепочечной и двуцепочечной ДНК. Для этих белков имеется большое количество связывающих мишеней, как в геномах, так и в РНК-транскриптах. Кроме того, существует множество белковых партнеров, специфично взаимодействующих с КН-доменными белками. В результате эти белки обладают способностью влиять на большое количество событий в клетке на транскрипционном, посттранскрипционном и трансляционном уровнях. Эволюционные, структурные и функциональные аспекты предыдущих исследований были рассмотрены ранее в других обзорах [3–7]. Здесь мы обсудили последние и наиболее важные достижения в исследовании функциональных особенностей этих белков, вовлеченных в процессы раннего развития, дифференцировки и пролиферации клеток.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ КН-ДОМЕННЫХ ПОЛИ(С)-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

КН-доменные поли(С)-связывающие белки как транскрипционные факторы. Способность КН-доменных поли(С)-связывающих белков взаимодействовать с С-богатыми областями одноцепочечной и двуцепочечной ДНК лежит в основе их активности в качестве регуляторов транскрипции. Одними из наиболее изученных генов-мишеней, регулируемых этими белками, являются *c-MYC* [8, 9] и *MOR* (ген μ -опиоидного рецептора) [10–12]. hnRNP-K и Pcbp1 активируют гены *c-MYC* и *MOR*, тогда как Pcbp3 действует как репрессор гена *MOR* [13]. Кроме того, hnRNP-K активирует транскрипцию гена нейронального никотинового рецептора ацетилхолина (*nAChR*) [14], нерцепторной тирозинкиназы (*SRC*) [15], белка восприимчивости к раку молочной железы первого типа (*BRCA1*) [16] и эукариотического фактора инициации трансляции 4E (*eIF4E*) [17]. hnRNP-K участвует в репрессии генов лейкосиалина или CD43 (*SPN*) [18] и тимидинкиназы (*tk*) человека посредством связывания с их промоторами [19]. В большинстве перечисленных случаев, похоже, действовали аналогичные механизмы: связывание КН-белка с одноцепочечной ДНК в кооперации с цис-связанными партнерами (Sp1 или другими)

предшествовало привлечению *транс*-действующих партнеров, таких, например, как ТАТА-связывающий белок (ТВР).

Недавние исследования значительно расширили список генов, регулируемых с участием hnRNP-K. Например, этот белок может действовать в ответ на повреждение ДНК как транскрипционный коактиватор гена *p53* [20]. hnRNP-K активирует промоторные элементы генов *KRAS* [21], тирозингидроксилазы (*Th*) [22], белка защиты теломер 1 (*pot1*) [23], Pregnane and xenobiotic receptor (*PXR*) [24] и гена фактора роста эндотелия (*VEGF*) [25], но ингибирует активность промотора гена *Nrf2* [26]. Также были выявлены новые общие черты механизма регуляции транскрипции с помощью hnRNP-K. GC-богатые области промотора формируют вторичные структуры: либо G-квадруплексы, либо i-мотивы, что обычно приводит к замедлению транскрипции генов. hnRNP-K совместно с другими факторами связывается с неспаренными цитозиновыми элементами в частично развернутой структуре i-мотива и после этого рекрутирует белки инициации транскрипции и РНК-полимеразного комплекса [21, 23, 25, 27]. hnRNP-K может также стимулировать транскрипционную активность, связываясь с двуцепочечной ДНК [22], при этом было показано, что как минимум три соседних цитозиновых прогона в двуцепочечной ДНК являются полезными для такой стимуляции [25, 27]. В нашей лаборатории обнаружено, что hnRNP-K, Pcbp1 и Pcbp2 связывают сайт 2A хорошо охарактеризованных дистальных и проксимальных энхансеров гена *Pou5f1* [28], который кодирует транскрипционный фактор Oct4, имеющий решающее значение для индукции и поддержания состояния плюрипотентных клеток (рис. 1, неопубликованные данные).

Альтернативный сплайсинг. Хорошо известно, что расположение сайтов сплайсинга контролируется взаимодействием определенных последовательностей на транскрипте со специфическими РНК-связывающими белками. КН-доменные поли(С)-связывающие белки с высокой аффинностью и специфичностью взаимодействуют с С-богатыми полипиримидиновыми мотивами интронов, расположенными на 5'-последовательности сайтов сплайсинга, и способны стимулировать сплайсинг некоторых экзонов. Усиление акцепторной активности сайтов сплайсинга часто связано с взаимодействием этих белков с комплексом малого ядерного рибонуклеопротеина U2 (U2 snRNP), который опосредован каноническим белком U2AF65, связывающим полипиримидиновые участки ДНК [29].

Специфическое связывание Pcbp1 с U1 snRNP в пресплайсесомальном комплексе бес-

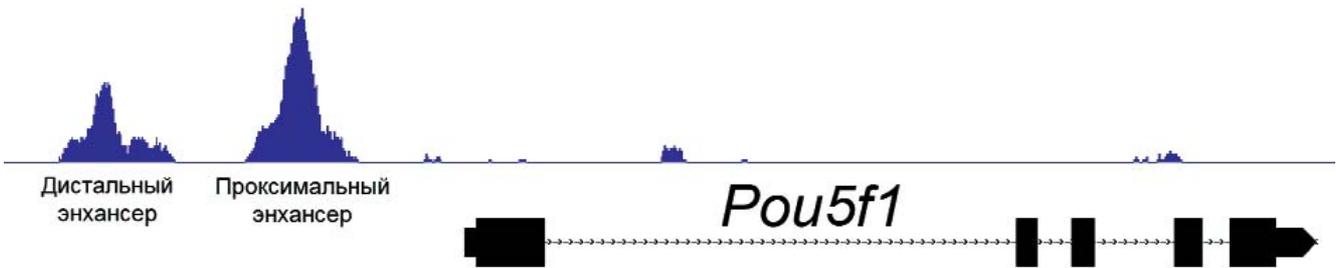


Рис. 1. Анализ последовательности ДНК методом секвенирования после иммунопреципитации хроматина (ChIP-seq), демонстрирующий присутствие белка hnRNP-K в дистальном и проксимальном энхансерах гена *Pou5f1* в ESC мышце

печивает остановку сплайсинга псевдоэкзона в рецепторе гормона роста человека, активация которого, в свою очередь, вызывает синдром Ларона [30]. Когда *Rcbp1* фосфорилируется киназой *Rak1*, он аккумулируется в ядре клетки, что приводит к альтернативному сплайсингу и включению экзона из *CD44*-репортерного минигена. Альтернативные виды сплайсинга, в свою очередь, опосредованы взаимодействием *Rcbp1* с *Casein α*, вспомогательным белком *U2 snRNP* [31]. Усиленная экспрессия *Rcbp1* ингибировала варианты сплайсинга гена *CD44*, включая *v3*, *v5*, *v6*, *v8* и *v10* в клетках HepG2 гепатомы человека, тогда как нокдаун эндогенного *Rcbp1* индуцировал экспрессию этих вариантов [32]. *Rcbp1* контролирует альтернативный сплайсинг гена *CD44* путем образования комплексов с TНAP-домен-содержащим белком 11 (TНAP11, белок *Ropin* у мышей), важным фактором для поддержания плюрипотентности и роста клеток. В клетках HepG2 избыточная экспрессия TНAP11 ингибировала сплайсинг *CD44*, включая вариант *v6*. Однако после удаления связывающего домена *Rcbp1* или нокдауна эндогенного *Rcbp1* TНAP11 не ингибировал экспрессию *v6 CD44*, что указывает на то, что TНAP11 действительно регулирует экспрессию *v6 CD44* посредством взаимодействия с *Rcbp1* [33].

Белок hnRNP-K также может взаимодействовать с факторами сплайсинга, такими как hnRNP A1, A2, G, L, D и U, Sam68, TAF15, SRp20, YB-1 и 9G8 [34, 35]. Кроме того, hnRNP-K является компонентом интронного энхансерного комплекса сплайсинга, который активирует сплайсинг альтернативного экзона 6A в пре-мРНК β-тропомиозина цыплят [36]. РНК-элемент на 3'-сайте сплайсинга гена синаптосомального белка 25 (*Snap25*) специфически связывается с hnRNP-K, который непосредственно конкурирует с фактором U2AF65 – важным компонентом ранних сплайсосом. Этот элемент имеет большое значение для осуществления альтернативного сплайсинга при дифференцировке нейронов. Также было показано, что такие мотивы

расположены выше 6-го экзона гена *Runx1*. Они связывают hnRNP-K, который необходим для репрессии экзона. Этот экзон кодирует пептидный домен, отвечающий за переключение активности транскрипционного репрессора/активатора *Runx1* и имеющий решающее значение для спецификации линий нейронов [37]. Venables et al. исследовали последствия нокдауна 14 основных белков hnRNP (включая hnRNP K) на 56 альтернативных событиях сплайсинга в апоптотических генах в нескольких линиях клеток человека: HeLa, PC-3 и VJТ. Наиболее значительные эффекты наблюдались при нокдаунах hnRNP-K и C. Кроме того, было отмечено двунаправленное влияние hnRNP-K на альтернативный сплайсинг, заключающееся как во включении, так и в исключении экзонов. Например, уменьшение экспрессии hnRNP-K приводило к включению 44 аминокислот в C-концевой домен каспазы семейства NLR (NALP1), к потере 43 аминокислотных остатков в активирующем пептидазу факторе апоптоза 1 (APAF1) и исключению 126-нуклеотидного экзона, кодирующего 42 аминокислоты тирозинкиназы 2 (PTK2B) [38].

Стабилизация и транспорт мРНК. Регуляция на уровне трансляции. Первый пример КН-доменного поли(С)-связывающего белка, функционирующего на посттранскрипционном уровне, показан в исследованиях мРНК α-глобина человека [39]. КН-белки могут связывать богатую пиримидином 3'-нетранслируемую область (3'-UTR) α-глобиновой мРНК с образованием «α-комплекса». Были идентифицированы три С-богатые области, которые необходимы для стабильности мРНК α2-глобина, и нарушение любого из трех С-насыщенных элементов в этой области разрушает сборку α-комплекса *in vitro* и снижает стабильность мРНК α-глобина *in vivo* [39, 40]. Сообщалось также, что и другие мРНК связывают КН-белки, которые подробно рассмотрены в обзоре Makeyev et al. [6].

За последние десятилетия список таких примеров продолжает расти. Экспрессия ДНК-по-

лимеразы H (POLH) регулируется посредством стабилизации мРНК с помощью Pcbp1, которая непосредственно связывается с 3'-UTR мРНК *POLH*. POLH принадлежит к Y-семейству ДНК-полимераз и необходима для восстановления повреждений ДНК, вызванных ультрафиолетовым облучением и канцерогенами посредством синтеза поврежденной ДНК [41]. С-богатый элемент в 3'-UTR мРНК *MOR* образует комплекс с Pcbp1, что приводит к стабилизации этой мРНК. Нокаун Pcbp1 уменьшает период полужизни мРНК *MOR*, что приводит к снижению экспрессии белка [42]. Кроме того, в клетках нейробластомы человека hnRNP-K и Pcbp1 индуцируют транслокацию мРНК *MOR* к трансляционно-активной полисомной фракции [43]. Связывание Pcbp1 с 3'-UTR мРНК ингибитора клеточного цикла *p27^{Kip1}* (*p27*) через домен КН1 стабилизирует мРНК и активирует экспрессию *p27* [44]. Белок Мена – регулятор актина – стимулирует образование рибонуклеопротеинового комплекса, который включает hnRNP-K и Pcbp1, а также регулирует локальную трансляцию сотен специфических мРНК при развитии аксонов [45]. Систематическая оценка аксональных мРНК, взаимодействующих с hnRNP-K, показала наличие hnRNP-K в РНК-регулонах, связанных с ростом аксонов [46]. Белок hnRNP-K также обеспечивает стабилизацию и перенос транскриптов в дендритах нейронов [47].

Pcbp1 взаимодействует с проксимальным *цис*-элементом и стабилизирует мРНК фактора ингибирования лейкемии (*lif*), мощным плеiotропным цитокином, вовлеченным в различные биологические процессы [48]. Недавно был описан интересный пример положительной обратной связи для Pcbp1 в клетках плаценты человека. Высокоаффинное взаимодействие между Pcbp1 и 25-нуклеотидным *цис*-элементом в 5'-UTR мРНК *Pcbp1* приводило к увеличению этих РНК-белковых комплексов и трансляции Pcbp1 [49]. В отличие от подавляющего большинства данных о позитивной регуляции экспрессии генов КН-белками, Pcbp2 отрицательно влияет на уровень мРНК G-белок-ассоциированного рецептора 56 (*GPR56*). Pcbp2 ингибирует экспрессию *GPR56* – регулятора индуцированной гипертрофии мышц при механической перегрузке. Также Pcbp2 способствует дегенерации мРНК *GPR56* в кардиомиоцитах, действуя как фактор, препятствующий гипертрофии в этих клетках [50].

Таким образом, вывод о роли КН-белков в качестве детерминант стабильности эукариотической мРНК, сделанный примерно два десятилетия назад [51], до сих пор поддерживается растущим числом экспериментальных доказательств.

Благодаря способности КН-белков связываться с мРНК, в некоторых случаях их регуляторная активность наблюдается на уровне трансляции. Торможение трансляции мРНК 15-липоксигеназы (*LOX*) тесно связано с образованием комплекса с эволюционно консервативным многократно повторяющимся CU-богатым мотивом (DICE, differentiation control element) в 3'-UTR. Этот DICE-элемент связывает hnRNP-K и Pcbp1, что приводит к образованию трансляционно неактивной мРНК в эритроидных клетках-предшественниках и в трансфицированных клетках [52]. Исследования механизмов показали, что белки hnRNP-K и Pcbp1 ингибируют DICE-содержащую мРНК, препятствуя соединению субъединицы 60S с комплексом 40S на инициаторном кодоне AUG [53]. Частично очищенные рекомбинантные hnRNP-K, Pcbp1 и Pcbp2 могут специфично связывать мРНК папилломавируса (HPV-16). Такое связывание, которое происходило на 3'-конце мРНК, эффективно ингибировало трансляцию мРНК HPV-16 *in vitro* [54]. Фосфорилирование Pcbp1, опосредованное трансформирующим фактором роста β (TGF- β), приводит к активации эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) при участии факторов disabled-2 (*Dab2*) и интерлейкинподобного индуктора EMT (*ILEI*). Нефосфорилированный Pcbp1 связывает 33-нуклеотидный структурный элемент (BAT) в 3'-UTR транскриптов *Dab2* и *ILEI*, подавляя их трансляцию. Активация TGF- β приводит к фосфорилированию Ser-43 Pcbp1 и к освобождению этого белка из элемента BAT с последующей трансляционной активацией мРНК *Dab2* и *ILEI* [55].

В противоположность ингибированию трансляции можно привести несколько примеров участия этих белков в трансляционной активации. Evans et al. показали, что hnRNP-K, Pcbp1 и Pcbp2 специфически взаимодействуют и связываются с сайтом входа рибосомы (IRES) мРНК *c-Myc*. Кроме того, добавление кДНК этих белков увеличивало активность IRES *in vivo* [56]. Pcbp2 специфически взаимодействует с основным доменом IV в IRES полиовируса и является важным фактором эффективной трансляции полиовирусной РНК в клетках HeLa [57]. Показано также, что 5'-концевая структура («клеверный лист», (5'CL)-Pcbp-комплекс) необходима для оптимальной трансляции полиовирусной РНК, причем домен КН3 Pcbp2 был идентифицирован как наиболее важная функциональная область [58]. Pcbp1 и Pcbp2 стимулируют трансляцию путем взаимодействия со структурой IRES в мРНК мишенях, как видно на примерах полиовируса [59] и мРНК *Bag1* [60]. Таким образом, взаимодействие поли(С)-связыва-

вающих белков с мРНК может способствовать как сайленсингу, так и стимуляции трансляции и, по-видимому, зависит от молекул-партнеров и типа клеток.

Описание необычной роли КН-белков в сдвиге рамки считывания дополняет список функций этих белков. Трансляционный контроль посредством запрограммированного рибосомального сдвига рамки считывания (PRF, programmed ribosomal frameshifting), широко используемого вирусами, также был задокументирован и для клеточных генов. Например, было показано, что *транс*-активация сдвига рамки считывания выполняется белковым комплексом, состоящим из субъединицы вирусной репликации *nsp1β* и клеточных КН-белков. Комплекс *Pcbp1/nsp1β* связывается с С-богатой последовательностью ниже «скользкой» последовательности и, тем самым, имитирует активность стимулятора PRF. Не все КН-белки способны стимулировать PRF. Отсутствие такой активности для *Pcbp4* и *hnRNP-K* может быть следствием отличий в их структурной организации [61].

Обмен железа. Железо необходимо для жизни, но оно также может привести и к гибели клеток [62, 63]. Железо участвует во многих важных биологических процессах, включая перенос кислорода (гемоглобин), биосинтез ДНК (кофактор рибонуклеотидредуктазы) и образование АТФ (кофактор для многих белков в цикле лимонной кислоты и цепях переноса электронов). Эукариотические клетки содержат сотни металлопротеинов, поддерживаемых внутриклеточными системами, которые координируют поглощение и распределение ионов металлов и металлосодержащих кофакторов. Известно, что раковые клетки накапливают внутриклеточное железо в результате изменения регуляции его метаболизма, частично путем стимуляции активности генов, участвующих в поглощении железа [62, 64]. *Pcbp1* и *Pcbp2* являются важными шаперонами железа в цитозоле и ядре клетки: они связывают железо, доставляя его ферментам, на хранение к ферритину или на экспорт через ферропортин. *Pcbp3* и *Pcbp4* экспрессируются на более низком уровне, что может быть причиной их невысокой эффективности в качестве шаперонов. Доставка железа к ферритину, регулируемая с помощью *Pcbp1*, является важным звеном в обмене железа в эритроцитах. При нарушении этого процесса возникают дефекты синтеза гема. Процесс доставки железа, вероятно, играет важную роль при дифференцировке клеток, поскольку связывание *Pcbp1* с ферритином на ранних стадиях дифференцировки выше, а на более поздних — ниже. Постнатальный дефицит *Pcbp1* у мышей приводит к дефициту

гема в эритропоэтических тканях и развитию микроцитарной анемии [7]. Снижение уровня *Pcbp1* или *Pcbp2* в клетках с помощью малых интерферирующих РНК (siРНК) приводило к потере активности железозависимых пролилгидроксилаз (PHD), что проявлялось в уменьшении пролилгидроксилирования, индуцируемого при гипоксии фактора α (HIF1 α), в нарушении деградации HIF1 α по VHL/протеасомному пути и накоплению активного транскрипционного фактора HIF1. В свою очередь, этот фактор способен активировать экспрессию >100 генов, участвующих в адаптации к пониженному уровню кислорода [65]. *Pcbp1* и *Pcbp2* необходимы для того, чтобы обеспечивать двухвалентным железом дезоксигидрогеназу-гидроксилазу (ДОНН) [66], которая катализирует вторую стадию превращения лизинового остатка в гипузин. Эта реакция жизненно важна и характерна для всех эукариот. В клетках со сниженным уровнем *Pcbp1* или *Pcbp2* накапливается деоксигипузин, а содержание гипузина уменьшается, что указывает на потерю активности ДОНН из-за недостатка железа в качестве кофактора [66]. *Pcbp2* образует функциональную единицу с гемоксидазой 1 (HO1) и NADPH-цитохромредуктазой P450 (CPR), которая интегрирует катаболизм гема со связыванием и переносом железа с помощью *Pcbp2*. Именно КН3-домен *Pcbp2* является значимым для взаимодействия HO1/*Pcbp2* [67]. Накопление железа может стимулировать аутоиммунные заболевания путем ускорения синтеза провоспалительных цитокинов. Wang et al. показали, что железо активирует экспрессию провоспалительных цитокинов в Т-клетках путем регуляции уровня белка *Pcbp1*. Недостаток *Pcbp1* или блокада поглощения железа в аутореактивных Т-клетках препятствуют индукции экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита [68]. *Pcbp2* представлен на относительно высоком уровне по сравнению с таковым *Pcbp1* в клетках линии G1E-ER4, являющихся эмбриональными стволовыми клетками мыши (mESC), однако он не обнаруживается в комплексе с ферритином в этих клетках. *Pcbp2* обладает активностью шаперона железа, но его функция часто отличается от таковой *Pcbp1* в большинстве клеток. В отличие от *Pcbp1*, *Pcbp2* связывается и активирует мембранные транспортеры, участвующие в импорте и оттоке железа [69, 70].

Следует отметить, что *Pcbp1* и *Pcbp2* играют заметную роль в метаболизме железа, что важно учитывать при интерпретации результатов экспериментов с регуляцией уровня экспрессии этих белков.

Другие функции. Благодаря способности взаимодействовать со многими элементами в нукле-

иновых кислотах и широким спектром белков, неудивительно, что КН-белки могут выполнять многие другие функции, примеры которых описаны ниже.

С помощью иммунопреципитации хроматина (ChIP) выявлено связывание hnRNP-K с рядом немедленных ранних генов (*IEG*), включая *EGR* (early growth response protein 1) и *ZFP36* (zinc finger protein 36 homolog), с наиболее высокими значениями плотности в сайтах терминации транскрипции. Также hnRNP-K может играть роль в привлечении 5'-3'-экзонуклеазы XRN2 в эти локусы генов, тем самым участвуя в согласовании процессинга 3'-конца пре-мРНК и терминации транскрипции [71]. Кроме этого, hnRNP-K участвует во взаимодействии критического элемента Xist РНК (XR-PID) с иницирующим комплексом поликомб (PCGF3/5-PRC1) для установления хромосомного сайленсинга [72]. Показано, что hnRNP-K ингибирует индуцированную тепловым шоком транскрипционную активность фактора теплового шока 1 (HSF1), непосредственно взаимодействуя с ним, что приводит к подавлению трансляции мРНК *hsp70* и *hsp27*. Взаимодействие белка Pcbp1 человека с сильно окисленной мРНК индуцирует реакции, связанные с апоптозом, включая активацию каспазы-3 и расщепление PARP1 (Poly[ADPribose] polymerase 1), запускающих апоптоз клеток [73].

КН-ДОМЕННЫЕ БЕЛКИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Клеточный цикл и рак. К настоящему времени опубликован значительный объем данных о влиянии КН-белков на клеточный цикл и/или опухолевый рост, однако некоторые из результатов являются довольно неоднозначными и противоречивыми. Как hnRNP-K, так и Pcbp1 в одних случаях могут выступать в качестве опухолевых супрессоров, а в других – в качестве онкогенов (табл. 1).

Экспрессия hnRNP-K повышена в злокачественных опухолях человека различных типов, и аберрантная локализация этого белка в цитоплазме обычно связана с плохим клиническим прогнозом у больных раком. Например, увеличение экспрессии hnRNP-K коррелирует с плохим прогнозом для пациентов с меланомой, простатитом, раком груди, легких и пищевода, колоректальным и гепатоцеллюлярным видами рака [74–78]. Нокдаун hnRNP-K значительно ингибировал рост опухолевых клеток мочевого пузыря [79]. Напротив, повышенная экспрессия hnRNP-K способствовала росту опухолевых клеток и образованию колоний. Экспрессия мРНК

циклинов A2, D1 и E2, необходимых для нормального осуществления всех событий клеточного цикла, была значительно снижена в клетках с дефицитом hnRNP-K. В то же время экспрессия мРНК *G0S2* (G0/G1 switch 2) была повышена, что может приводить к остановке клеточного цикла. Количественный анализ hnRNP-K в промоторных областях генов с помощью иммунопреципитации хроматина (ChIP) и количественной ПЦР (qPCR) показал, что нокдаун hnRNP-K приводил к снижению уровня hnRNP-K в промоторных областях циклина D1 и *G0S2*, где уровень РНК-полимеразы II либо снижался (в случае циклина D1), либо увеличивался (в случае *G0S2*) [79].

Белковый фактор MYU – прямая мишень сигнального пути Wnt/c-Мус – активируется в большинстве видов опухолей толстой кишки и определяет их опухолегенность. MYU связывается с hnRNP-K для стабилизации экспрессии циклинзависимой киназы 6 (CDK6) и тем самым способствует переходу G1-S клеточного цикла. Эти результаты свидетельствуют о том, что ось MYU/hnRNP-K/CDK6 функционирует по сигналу Wnt/c-Мус и играет критическую роль в пролиферации и опухолегенности раковых клеток толстой кишки [80]. Полоподобные киназы 1 (PLK1), как и hnRNP-K, положительно связаны со злокачественными опухолями нескольких типов, и высокий уровень их экспрессии коррелирует с неблагоприятным прогнозом [81]. Нокдаун hnRNP-K приводит к уменьшению экспрессии PLK1, и, наоборот, избыточная экспрессия hnRNP-K способствует увеличению уровня PLK1. hnRNP-K стимулирует экспрессию PLK1 через КН1- и КН2-домен-зависимые взаимодействия с 3'-UTR мРНК *PLK1*. Было также обнаружено, что подавление PLK1 путем сайленсинга hnRNP-K снижает способность клеток к делению и индуцирует апоптоз [81]. Кроме того, hnRNP-K и матриксная металлопротеиназа 2 (MMP2) были идентифицированы как жизненно важные мишени для DOC-2/DAB2-взаимодействующего белка (DAB2IP) в раковых клетках прямой кишки (CRC). Снижение уровня DAB2IP увеличивает экспрессию hnRNP-K через сигнальный путь MAPK/ERK. Транслокация hnRNP-K в ядро усиливает транскрипционную активность MMP2 и способствует инвазии CRC и метастазированию [82]. Кроме того, нокдаун hnRNP-K ингибировал гены хеморезистентности, такие как *ERCC1* и *ERCC4*, однако стимулировал проапоптотические гены, такие как *CASP7* (ген каспазы-7) и *XAF1* [79]. Снижение экспрессии hnRNP-K способствует также повышению уровней каспазы-8 и каспазы-3, усилению апоптоза клеток и остановке клеточного

Таблица 1. Противоположные функции КН-доменных поли(С)-связывающих белков в опухолевых клетках

Белок	Вид рака/клетки	Эффект/функция	Мишень	Ссылка
hnRNP-K	рак мочевого пузыря	онкоген	промоторы циклина D1 и <i>G0S2</i>	[79]
hnRNP-K	рак толстой кишки	онкоген	мРНК <i>CDK6</i>	[80]
hnRNP-K	несколько видов рака	онкоген	мРНК <i>PLK1</i>	[81]
hnRNP-K	колоректальный рак	онкоген	<i>MMP2</i>	[82]
hnRNP-K	рак желудка	онкосупрессор	<i>p53/p21/CCND1</i>	[85]
hnRNP-K	острый миелоидный лейкоз	онкосупрессор	<i>p21</i>	[86]
Pcbp1 и Pcbp2	K562	контроль клеточного цикла	мРНК <i>p21</i>	[93]
Pcbp1	NMuMG	контроль клеточного цикла	мРНК <i>Cdc27</i>	[94]
Pcbp1	K562, MEL	контроль клеточного цикла	мРНК <i>CDK2</i>	[95]
Pcbp1	A2780, MDA-MB-231	онкосупрессор	мРНК <i>p27</i>	[44]
Pcbp1	рак простаты	онкосупрессор	<i>MAPK1</i>	[96]
Pcbp1	рак молочной железы	онкосупрессор	мРНК <i>PNUTS</i>	[98]
Pcbp1	несколько видов рака	онкоген	мРНК <i>CD44</i> и др.	[102]

цикла подоцитов на стадии G0/G1, что приводит к протеинурии при многих хронических заболеваниях почек [83]. hnRNP-K участвует в функционировании MYC-регулируемых длинных некодирующих РНК (MYCLOs), которые имеют значение в трансформации рака и канцерогенезе. MYCLOs играют роль в пролиферации клеток и клеточном цикле, регулируя экспрессию генов-мишеней MYC, таких как ген белка ингибитора циклин-зависимой киназы 1A (CDKN1A, *p21*) и 2B (CDKN2B, *p15*) [84].

Недавно были описаны примеры функционирования hnRNP-K в качестве опухолевого супрессора. Повышенная экспрессия hnRNP-K ингибировала пролиферацию клеток рака желудка через сигнальный путь *p53/p21/CCND1* и подавляла рост опухоли. Биоинформатический анализ показал, что ассоциированные с hnRNP-K гены были связаны с клеточным циклом и процессом репликации ДНК. Анализ белок-белковых взаимодействий показал, что hnRNP-K физически взаимодействует с опухолевыми антигенами *p53*, *p21* и продуктами других генов, оказывающими влияние на опухолевый рост. Нокдаун hnRNP-K в клетках рака желудка блокировал сигнальный путь *p53* и уменьшал уровень экспрессии *p53* и *p21*, в то время как повышенная экспрессия hnRNP-K демонстрировала противоположный эффект [85]. Gallardo et al. показали, что снижение экспрессии hnRNP-K ведет к усилению пролиферации острой миелоидной лейкемии, которая напрямую связана со сниженной способностью к активации транскрипции *p21* [86].

Два классических сигнальных пути, онкосупрессивный и онкогенный, находятся непосредственно под влиянием hnRNP-K: пути *p53/p21* и

c-Myc соответственно. hnRNP-K также непосредственно влияет на экспрессию как онкогенов, так и опухолевых супрессоров, таких как SRC, MYC, HDM2 и EIF4E, благодаря его прямому связыванию с С-богатыми областями в промоторах генов этих факторов [4, 17, 87, 88]. В дополнение к регуляции экспрессии многих белков посредством связывания с промоторами hnRNP-K может действовать с помощью других механизмов и при этом влиять на экспрессию генов в раковых клетках. Например, hnRNP-K регулирует экспрессию гена путем прямого взаимодействия с ТАТА-связывающим белком (ТВР) [89], связывания с lincRNA-21 [90, 91], а также путем взаимодействия с репрессивным комплексом Polycomb через его основной компонент — Eed [92]. Таким образом, hnRNP-K задействован в чрезвычайно разнообразных регуляторных путях и механизмах, что отражается в широком спектре различных эффектов.

Белки Pcbp1 и Pcbp2 также являются важными эффекторами клеточного цикла и, как следствие, оказывают значительное влияние на опухоли, где они часто действуют как онкосупрессоры (табл. 1). Комбинированное ингибирование синтеза Pcbp1 и Pcbp2 приводило к замедлению клеточной пролиферации и к задержке клеток в фазе G1 клеточного цикла. Эффект комбинированного ингибирования выявил индукцию мРНК и белка *p21*. Было обнаружено, что мРНК *p21* взаимодействует с белками Pcbp1 и Pcbp2, благодаря чему достигается ее стабилизация. Эти данные свидетельствуют о том, что Pcbp1 и 2 играют роль в *p53*-независимом контроле клеточного цикла посредством посттранскрипционной модуляции экспрессии гена *p21* [93]. Гомо-

лог белка цикла клеточного деления 27 (CDC27) является основным компонентом способствующего развитию анафазы комплекса, осцилляторная активность которого отвечает за переход метафазы в анафазу и митотический исход. Синтез белка CDC27 контролируется посттранскрипционно через Pcbp1. Нарушение Pcbp1-опосредованной транскрипционной регуляции CDC27 приводит к нестабильности хромосом и анеуплоидии. При этом уровень белка CDC27 представляет собой надежный маркер рецидива рака молочной железы [94]. Связывание Pcbp1 с С-богатым полипиримидиновым трактом, предшествующим экзону 5 в транскрипте регулятора клеточного цикла – циклинзависимой киназы 2 (CDK2) – усиливает включение этого экзона. Исключение экзона 5 из мРНК CDK2 резко подавляет экспрессию белка CDK2, что приводит к нарушению кинетики клеточного цикла [95]. Ингибитор клеточного цикла p27^{Kip1} (p27) является новым транскриптом, связанным с Pcbp1. Повышенный уровень белка p27 последовательно ингибирует клеточную пролиферацию, ход событий клеточного цикла и канцерогенез. Нокдаун Pcbp1, в свою очередь, компрометирует стабильность мРНК p27, что приводит к снижению уровня белка p27 и к повышению опухоленеза *in vivo* [44].

Pcbp1 может действовать как супрессор опухоли в эпителиальных клетках предстательной железы путем ингибирования экспрессии митоген-активируемой протеинкиназы 1 (MAPK1) [96]. Экспрессия Pcbp1 и микроРНК 3978 (miR-3978) подавляется при метастазировании перитонеального рака желудка. Возобновление нормальной экспрессии Pcbp1 или miR-3978 в клеточной линии перитонеального метастаза уменьшало синтез белка легумина и хемосенсибилизировало клетки, что облегчало воздействие на них доцетаксела [97]. Связывание Pcbp1 со структурным элементом, расположенным в экзоне 12 мРНК *PNUTS* (также известной как *PPP1R10*), регулирует ее альтернативный сплайсинг. Отсутствие Pcbp1 в этом структурном элементе в результате сайленсинга дает ход альтернативному сплайсингу мРНК *PNUTS*, в результате которого генерируется некодирующая изоформа *PNUTS* (*lncRNA-PNUTS*). В мезенхимальных опухолевых клетках молочной железы и в образцах опухолей молочной железы экспрессия *lncRNA-PNUTS* повышена [98]. Pcbp1 действует как онкогенный и метастатический супрессор в опухолевых клетках желудка, прямой кишки и легких [99] и ингибирует метастазы при раке легкого [100]. При подавлении эндогенного Pcbp1 в клетках нейробластомы человека были идентифицированы 328 транскриптов с уменьшенной экспрес-

сией и 47 транскриптов с повышенной экспрессией. Онтологический анализ выявленных транскриптов позволил идентифицировать их как связанные с нейрональными, метаболическими сигнальными путями (Wnt, TGF- β), регуляторами развития, ядерными рецепторами, факторами дифференцировки и трансляции [101].

Pcbp1 является одной из мишеней пути TGF- β , посредством которого Pcbp1 становится фосфорилированным. TGF- β -опосредованное фосфорилирование Pcbp1 индуцирует ЕМТ с последующим развитием и метастатическим прогрессированием опухолей [55]. В раковых клетках фосфорилированный по С-концу SMAD3 ассоциируется с Pcbp1, связывает пре-мРНК, ингибирует привлечение вспомогательного фактора 2 U2 snRNP (U2AF2) и сплайсосомную сборку на субоптимальных экзонах. Это влияет на альтернативный сплайсинг *CD44* и других генов, связанных с ЕМТ, которые способствуют развитию раковых опухолей [102]. С другой стороны, снижение уровня белка Pcbp1 может привести к стимулированию опухолевого роста. Ингибин (Inhibin) β A, член надсемейства TGF- β , транскрипционно регулируется TGF- β через Pcbp1. Обработка TGF- β или нокдаун Pcbp1 активирует трансляцию транскрипта ингибина β A, что приводит к увеличению экспрессии и секретиремых уровней ингибина β A. Такая повышающая трансляционная регуляция ингибина β A усиливает миграцию и инвазию клеток, которые прошли ЕМТ, и способствует злокачественному росту *in vivo* [103].

Таким образом, функции как hnRNP-K, так и Pcbp1 довольно разнообразны, а их влияние может приводить к различным последствиям для клеток. По-видимому, проявление тех или иных функций этих белков зависит от типа клеток или тканей.

Раннее развитие, плюрипотентность и дифференцировка клеток. hnRNP-K экспрессируется на высоком уровне в ооцитах и преимплантационных эмбрионах мышей. В ооцитах hnRNP-K накапливается в зародышевой везикуле, где он кластеризован. После распада зародышевой везикулы hnRNP-K распределяется по цитоплазме диффузно. Однако после оплодотворения белок перераспределяется в пронуклеусы самки и самца, а впоследствии наблюдается в ядрах бластомера [104].

Через четыре дня после нокдауна hnRNP-K в эмбриональных стволовых клетках мыши (mESC) наблюдалось значительное уменьшение общего количества клеток в культуре, образование типичных колоний, а экспрессия маркеров плюрипотентности Oct4, Nanog и Sox2 была значительно снижена. Кроме того, методом иммунопреципитации хроматина с помощью антител к

hnRNP-K продемонстрировано присутствие этого белка в промоторных областях, ассоциированных с плюрипотентностью генов *Nanog*, *Sox2* и *Fgf4* в составе активационного комплекса с некодирующей РНК *TUNA* (Tcl1 Upstream Neuron-Associated lincRNA) [105]. Эти факты указывают на активирующий эффект hnRNP-K, однако имеются другие данные, которые контрастируют с заключением относительно участия hnRNP-K в регуляции генов, контролирующих плюрипотентность (табл. 2). Например, было продемонстрировано, что при репрограммировании эмбриональных фибробластов мыши в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) hnRNP-K инактивирует ряд генов плюрипотентности посредством поддержания метилирования H3K9me3 и CpG в промоторах этих генов путем взаимодействия с некодирующей РНК – *lincRNA-p21* [106]. Когда концентрация *lincRNA-p21* или мРНК *hnRNP-K* была экспериментально снижена, уровень мРНК многих генов-регуляторов плюрипотентности, таких как *Esrrb*, *Lin28a*, *Utf1*, *Nr5a2*, *Sall4*, *Lefty2* и *Nanog*, был значительно увеличен [106]. Кроме того, в нескольких исследованиях [107–109] не было обнаружено влияния нокдауна hnRNP-K на экспрессию плюрипотентных факторов. siРНК-скрининг генов, влияющих на экспрессию основных фак-

торов плюрипотентности, не выявил значительного эффекта ни hnRNP-K, ни *Pcbp1–4* как в mESC [108], так и в эмбриональных стволовых клетках человека (hESC) [107]. Однако hnRNP-K был первым в списке факторов, важных для пролиферативной активности hESC [107]. В другом исследовании показано, что при нокдауне *hnRNP-K* экспрессия 264 генов была усилена, а 26 генов – подавлена [109]. Значительных изменений в синтезе мРНК факторов плюрипотентности не было обнаружено, однако продемонстрировано повышение уровней мРНК маркеров энтодермы и мезодермы: *Gata6*, *Gata3*, *Tbx3*, *Tbx20*, *Foxa1*, *Nkx2-9* и *Nkx2-2*. Экспрессия *Gata6* была настолько значительно увеличена в клетках с нокдауном hnRNP-K [109], что само по себе должно быть достаточным для индуцирования потери плюрипотентности и переходу к энтодермальной дифференцировке [110]. Несмотря на то что hnRNP-K занимает ключевые регуляторные элементы гена *Oct4 in vivo* (рис. 1), нокдаун гена *hnRNP-K* с использованием методики для направленного редактирования геномов (CRISPR/Cas9) не оказывает заметного влияния на экспрессию белка *Oct4* в mESC (рис. 2, неопубликованные данные).

Используя эмбриональные фибробласты мыши и гемопоэтические стволовые клетки-пред-

Таблица 2. Влияние потери функции КН-белков на экспрессию факторов, ассоциированных с плюрипотентностью, пролиферативную активность клеток и развитие эмбриона

Воздействие	Эффект	Ссылка
Нокдаун <i>hnRNP-K</i>	снижение уровней <i>Oct4</i> , <i>Sox2</i> , <i>Nanog</i> в mESC	[105]
Нокдаун <i>hnRNP-K</i>	повышение уровней <i>Esrrb</i> , <i>Lin28a</i> , <i>Utf1</i> , <i>Nr5a2</i> , <i>Sall4</i> , <i>Lefty2</i> , <i>Nanog</i> при репрограммировании эмбриональных фибробластов мыши в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC)	[106]
Нокдаун <i>Pcbp1</i> или <i>Pcbp2</i> или <i>hnRNP-K</i>	отсутствие значительного влияния на экспрессию <i>Oct4</i> в mESC	[108]
Нокдаун <i>Pcbp1</i> или <i>Pcbp2</i> или <i>hnRNP-K</i>	отсутствие значительного влияния на экспрессию маркеров плюрипотентности в hESC	[107]
Нокдаун <i>hnRNP-K</i>	отсутствие влияния на экспрессию маркеров плюрипотентности, значительно повышен уровень <i>Gata6</i> и <i>Gata3</i> в mESC	[109]
Нокдаун <i>hnRNP-K</i>	снижение пролиферативной активности hESC	[107]
Гаплонедостаточность <i>hnRNP-K</i>	стимуляция клеточной пролиферации эмбриональных фибробластов мыши и гемопоэтических стволовых клеток-предшественников (mHSC)	[86]
Биаллельная делеция <i>hnRNP-K</i>	гибель эмбриона на 13–14-й день	[86]
Биаллельная мутация <i>Pcbp1</i>	гибель эмбриона на 3–8-й день	[115], [116]
Биаллельная мутация <i>Pcbp2</i>	гибель эмбриона на 12–14-й день	[115]

шественники (mHSC), Gallardo et al. продемонстрировали, что снижение экспрессии hnRNP-K приводит к стимуляции клеточной пролиферации, которая была связана с подавлением транскрипции *p21*. Было также показано, что гапло-недостаточность по *hnRNP-K* приводит к снижению выживаемости, увеличению образования опухолей, нестабильности генома, а также к развитию гемопоэтических новообразований с миелопролиферацией [86]. Наиболее ярким свидетельством того, что hnRNP-K необходим для развития, является наблюдение, что биаллельный нокаут по *hnRNP-K* имеет летальный фенотип на 13–14-й день (E13.5) [86]. hnRNP-K и гемопоэтический фактор транскрипции PU.1 (PU.1) образуют комплекс на промоторе *CD11b*, белковый продукт которого является маркером зрелых гранулоцитов и моноцитов. Хотя hnRNP-K и PU.1 действуют синергически во время гранулоцитарной дифференцировки, hnRNP-K, по-видимому, оказывает отрицательное влияние на

активность PU.1 во время созревания моноцитов [111]. hnRNP-K также имеет значение для дифференциации остеокластов и участвует в нескольких функциях фактора GSK3 β , который является критическим для дифференцировки и функций этих клеток [112].

Pcbp1 и Pcbp2 также играют важную роль в раннем развитии и дифференцировке. Материнский Pcbp1 определяет синхронизацию образования нормального пронуклеуса в ооцитах мыши [113], а также требуется для поддержания состояния сайленсинга транскрипции в зрелых ооцитах мыши [114]. Мутантные эмбрионы мыши, гомозиготные по *Pcbp1*, погибают в период с третьих до восьмых суток развития (E3.5–8.5) [115, 116]. Эти результаты могут указывать на проблему перехода плюрипотентных стволовых клеток от наивного (mESC) к праймированному (EpiSC) состоянию, который происходит вскоре после имплантации (E5.5 у мыши). Действительно, используя опосредованный CRISPR/Cas9

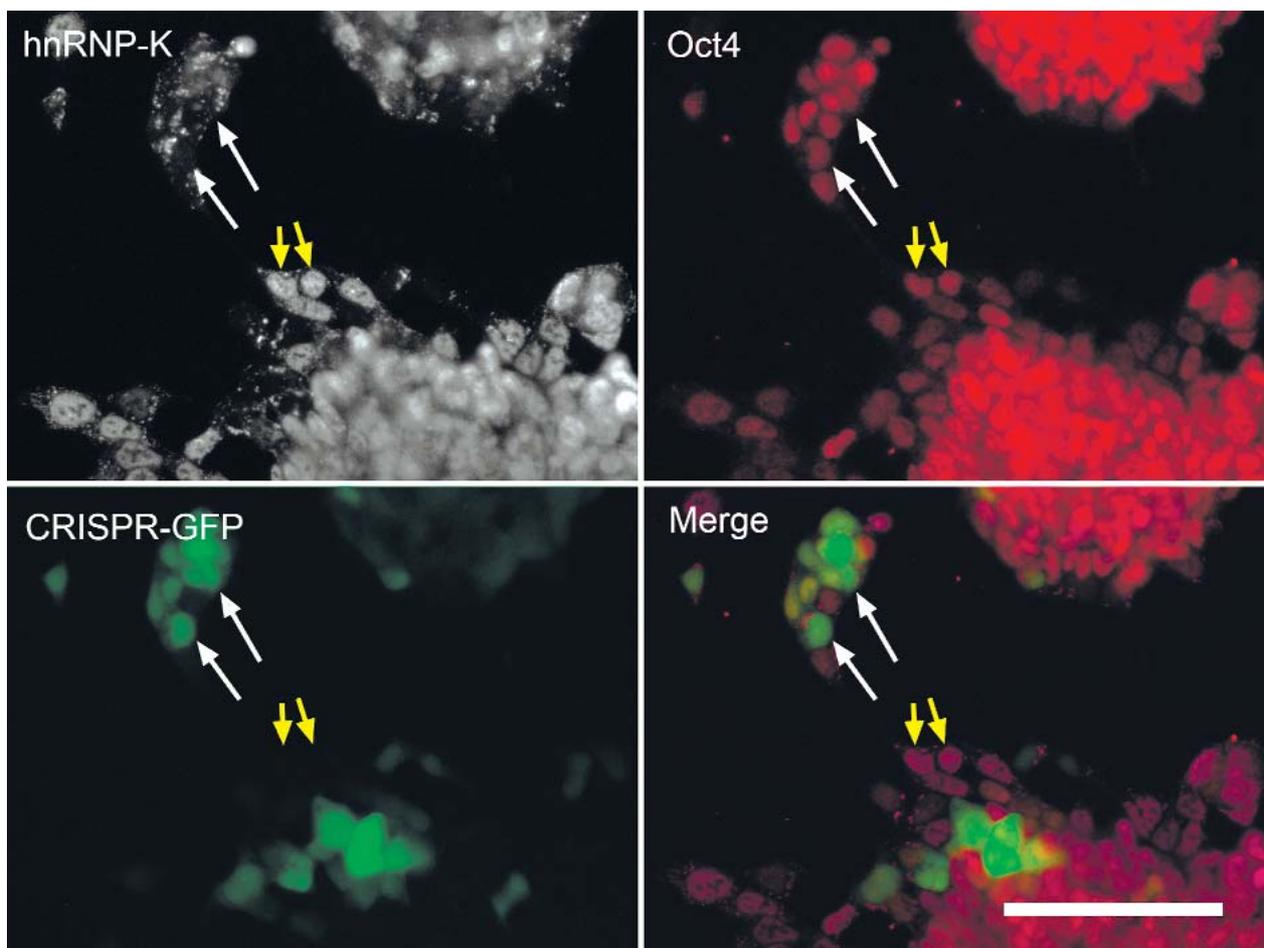


Рис. 2. Нокаут *hnRNP-K* с помощью CRISPR/Cas9 не приводит к изменению уровня белка Oct4 (4 дня после нокаута). Белые стрелки указывают на клетки с нокаутом *hnRNP-K*, желтые стрелки – на клетки дикого типа. Длина масштабного отрезка – 100 мкм.

С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

нокаут, мы получили *Pcbp1*^{-/-}-жизнеспособные клоны mESC. Во время перехода mESC от наивного к праймированному (EpiSC) плюрипотентному состоянию *in vitro*, индуцированному путем изменения условий культивирования [117], мы наблюдали массивную гибель mESC *Pcbp1*^{-/-}, сопровождавшуюся повышением уровня маркеров энтодермы (рис. 3, неопубликованные данные). Напротив, развитие гомозигот, мутантных по *Pcbp2*, протекает нормально до второго триместра беременности (E12.5–13.5), затем наблюдается значительное снижение жизнеспособности эмбрионов, связанное с комбинированными сердечно-сосудистыми и гемопозитическими аномалиями. Мыши, гетерозиготные по одному из аллелей, имели дефекты только при начальном наборе веса и в послеродовом периоде [115]. Уровень экспрессии *Pcbp1* зависит от стадии развития организма. Например, у мышей в скелетной мышце на эмбриональных и ранних стадиях развития детектировали высокие уровни *Pcbp1*, тогда как во взрослой мышце содержание *Pcbp1* снижалось [116]. Как при ингиби-

ровании гена *Pcbp1* в миобластах скелетных мышц мыши с помощью siРНК, так и у мыши с гипоморфной мутацией по *Pcbp1* наблюдалось нарушение регуляции пролиферации и дифференцировки мышечных клеток. Кроме того, *Pcbp1* модулировал процессинг обогащенных в мышцах miR-1, miR-133 и miR-206, физически взаимодействуя с AGO2 (Argonaute 2) и другими компонентами, участвующими в регуляции образования miРНК [116]. Утверждается, что *Pcbp1* является центральным регулятором, необходимым для поддержания стволовых клеток рака предстательной железы [118].

Таким образом, хотя вклад КН-доменных поли(С)-связывающих белков в поддержание плюрипотентности остается неясным, их важная роль в обеспечении ключевых процессов как на ранних стадиях развития организмов, так и в клеточной дифференцировке несомненна.

КН-доменные поли(С)-связывающие белки являются представителями большой группы многофункциональных белков hnRNP, где они

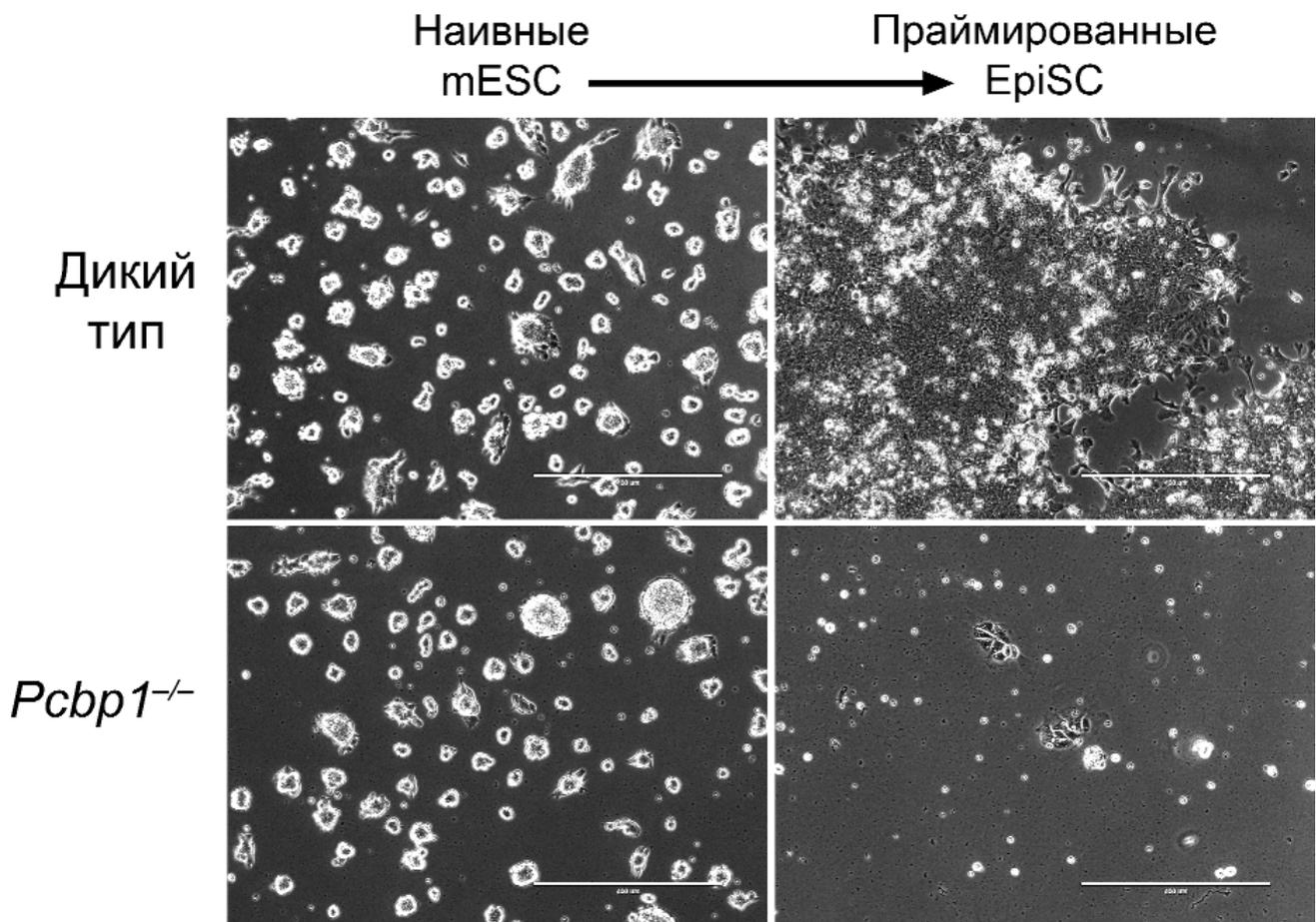


Рис. 3. Переход наивных ESC мыши *Pcbp1*^{-/-} в праймированное состояние сопровождается массовой гибелью клеток *in vitro*. Длина масштабного отрезка – 400 мкм

представляют собой только отдельные компоненты факторов широкого спектра, которые взаимно организуют обширную сеть взаимодействия сигналов, событий и процессов в живой клетке. Эти белки, как и hnRNP-K, служат для согласования сигналов под управлением нуклеиновой кислоты, где белки воспринимают, соединяют и интегрируют сигналы из многих регуляторных каскадов [34]. В целом это придает клетке функциональную пластичность, создает множество альтернатив в развитии, включая выбор клеточной судьбы.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 17-14-01407).

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Siomi, H., Matunis, M.J., Michael, W.M., and Dreyfuss, G. (1993) The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif, *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1193–1198.
2. Valverde, R., Edwards, L., and Regan, L. (2008) Structure and function of KH domains, *FEBS J.*, **275**, 2712–2726, doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06411.x.
3. Choi, H.S., Hwang, C.K., Song, K.Y., Law, P.Y., Wei, L.N., and Loh, H.H. (2009) Poly(C)-binding proteins as transcriptional regulators of gene expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **380**, 431–436, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.01.136.
4. Gallardo, M., Hornbaker, M.J., Zhang, X., Hu, P., Bueso-Ramos, C., and Post, S.M. (2016) Aberrant hnRNP K expression: all roads lead to cancer, *Cell Cycle*, **15**, 1552–1557, doi: 10.1080/15384101.2016.1164372.
5. Geuens, T., Bouhy, D., and Timmerman, V. (2016) The hnRNP family: insights into their role in health and disease, *Hum. Genet.*, **135**, 851–867, doi: 10.1007/s00439-016-1683-5.
6. Makeyev, A.V., and Liebhaber, S.A. (2002) The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms, *RNA*, **8**, 265–278, doi: 10.1007/s00439-016-1683-5.
7. Philpott, C.C., Ryu, M.S., Frey, A., and Patel, S. (2017) Cytosolic iron chaperones: proteins delivering iron cofactors in the cytosol of mammalian cells, *J. Biol. Chem.*, **292**, 12764–12771, doi: 10.1074/jbc.R117.791962.
8. Michelotti, G.A., Michelotti, E.F., Pullner, A., Duncan, R.C., Eick, D., and Levens, D. (1996) Multiple single-stranded cis elements are associated with activated chromatin of the human *c-myc* gene *in vivo*, *Mol. Cell Biol.*, **16**, 2656–2669.
9. Ostrowski, J., Kawata, Y., Schullery, D.S., Denisenko, O.N., and Bomsztyk, K. (2003) Transient recruitment of the hnRNP K protein to inducibly transcribed gene loci, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3954–3962.
10. Choi, H.S., Song, K.Y., Hwang, C.K., Kim, C.S., Law, P.Y., Wei, L.N., and Loh, H.H. (2008) A proteomics approach for identification of single strand DNA-binding proteins involved in transcriptional regulation of mouse mu opioid receptor gene, *Mol. Cell Proteomics*, **7**, 1517–1529, doi: 10.1074/mcp.M800052-MCP200.
11. Kim, S.S., Pandey, K.K., Choi, H.S., Kim, S.Y., Law, P.Y., Wei, L.N., and Loh, H.H. (2005) Poly(C) binding protein family is a transcription factor in mu-opioid receptor gene expression, *Mol. Pharmacol.*, **68**, 729–736.
12. Rivera-Gines, A., Cook, R.J., Loh, H.H., and Ko, J.L. (2006) Interplay of Sps and poly(C) binding protein 1 on the mu-opioid receptor gene expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **345**, 530–537, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.04.117.
13. Choi, H.S., Kim, C.S., Hwang, C.K., Song, K.Y., Law, P.Y., Wei, L.N., and Loh, H.H. (2007) Novel function of the poly(C)-binding protein alpha CP3 as a transcriptional repressor of the mu opioid receptor gene, *FASEB J.*, **21**, 3963–3973, doi: 10.1096/fj.07-8561com.
14. Du, K., Melnikova, I.N., and Gardner, P.D. (1998) Differential effects of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K on Sp1- and Sp3-mediated transcriptional activation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor promoter, *J. Biol. Chem.*, **273**, 19877–19883.
15. Ritchie, S.A., Pasha, M.K., Batten, D.J.P., Sharma, R.K., Olson, D.J.H., Ross, A.R.S., and Bonham, K. (2003) Identification of the SRC pyrimidine-binding protein (SPy) as hnRNP K: implications in the regulation of SRC1A transcription, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 1502–1513.
16. Thakur, S., Nakamura, T., Calin, G., Russo, A., Tamburino, J.F., Shimizu, M., Baldassarre, G., Battista, S., Fusco, A., Wassell, R.P., Dubois, G., Alder, H., and Croce, C.M. (2003) Regulation of BRCA1 transcription by specific single-stranded DNA binding factors, *Mol. Cell Biol.*, **23**, 3774–3787, doi: 10.1128/mcb.23.11.3774-3787.2003.
17. Lynch, M., Chen, L., Ravitz, M.J., Mehtani, S., Korenblat, K., Pazin, M.J., and Schmidt, E.V. (2005) hnRNP K binds a core polypyrimidine element in the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) promoter, and its regulation of eIF4E contributes to neoplastic transformation, *Mol. Cell Biol.*, **25**, 6436–6453, doi: 10.1128/MCB.25.15.6436-6453.2005.
18. Da Silva, N., Bharti, A., and Shelley, C.S. (2002) hnRNP-K and Pur(alpha) act together to repress the transcriptional activity of the *CD43* gene promoter, *Blood*, **100**, 3536–3544.
19. Lau, J.S., Baumeister, P., Kim, E., Roy, B., Hsieh, T.Y., Lai, M., and Lee, A.S. (2000) Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as regulators of gene expression through interactions with the human thymidine kinase promoter, *J. Cell Biochem.*, **79**, 395–406.
20. Moumen, A., Magill, C., Dry, K.L., and Jackson, S.P. (2013) ATM-dependent phosphorylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K promotes p53 transcriptional activation in response to DNA damage, *Cell Cycle*, **12**, 698–704, doi: 10.4161/cc.23592.
21. Kaiser, C.E., Van Ert, N.A., Agrawal, P., Chawla, R., Yang, D., and Hurley, L.H. (2017) Insight into the complexity of the i-motif and G-quadruplex DNA structures formed in the KRAS promoter and subsequent drug-induced gene repression, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 8522–8536, doi: 10.1021/jacs.7b02046.
22. Banerjee, K., Wang, M., Cai, E., Fujiwara, N., Baker, H., and Cave, J.W. (2014) Regulation of tyrosine hydroxylase transcription by hnRNP K and DNA secondary structure, *Nat. Commun.*, **5**, 5769, doi: 10.1038/ncomms6769.

23. He, Q., Zeng, P., Tan, J.H., Ou, T.M., Gu, L.Q., Huang, Z.S., and Li, D. (2014) G-quadruplex-mediated regulation of telomere binding protein POT1 gene expression, *Biochim. Biophys. Acta*, **1840**, 2222–2233, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.03.001.
24. Saradhi, M., Kumari, S., Rana, M., Mukhopadhyay, G., and Tyagi, R.K. (2015) Identification and interplay of sequence specific DNA binding proteins involved in regulation of human Pregnane and Xenobiotic Receptor gene, *Exp. Cell Res.*, **339**, 187–196, doi: 10.1016/j.yexcr.2015.11.014.
25. Uribe, D.J., Guo, K., Shin, Y.J., and Sun, D. (2011) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and nucleolin as transcriptional activators of the vascular endothelial growth factor promoter through interaction with secondary DNA structures, *Biochemistry*, **50**, 3796–3806, doi: 10.1021/bi101633b.
26. Ghosh, A., Abdo, S., Zhao, S., Wu, C.H., Shi, Y., Lo, C.S., Chenier, I., Alquier, T., Filep, J.G., Ingelfinger, J.R., Zhang, S.L., and Chan, J.S.D. (2017) Insulin Inhibits Nrf2 gene expression via heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/K in diabetic mice, *Endocrinology*, **158**, 903–919, doi: 10.1210/en.2016-1576
27. Sutherland, C., Cui, Y., Mao, H., and Hurley, L.H. (2016) A mechanosensor mechanism controls the G-quadruplex/i-motif molecular switch in the MYC promoter NHE III₁, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 14138–14151, doi: 10.1021/jacs.6b09196.
28. Nazarov, I.B., Krasnoborova, V.A., Mitenberg, A.G., Chikhirzhina, E.V., Davidov-Sinitzin, A.P., Liskovych, M.A., and Tomilin, A.N. (2014) Transcription regulation of *Oct4* (Pou5F1) gene by its distal enhancer, *Cell Tissue Biol.*, **8**, 27–32, doi: 10.1134/s1990519x14010106.
29. Ji, X., Park, J.W., Bahrami-Samani, E., Lin, L., Duncan-Lewis, C., Pherribo, G., Xing, Y., and Liebhaber, S.A. (2016) α CP binding to a cytosine-rich subset of polypyrimidine tracts drives a novel pathway of cassette exon splicing in the mammalian transcriptome, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 2283–2297, doi: 10.1093/nar/gkw088.
30. Akker, S.A., Misra, S., Aslam, S., Morgan, E.L., Smith, P.J., Khoo, B., and Chew, S.L. (2007) Pre-spliceosomal binding of U1 small nuclear ribonucleoprotein (RNP) and heterogeneous nuclear RNP E1 is associated with suppression of a growth hormone receptor pseudoexon, *Mol. Endocrinol.*, **21**, 2529–2540, doi: 10.1210/me.2007-0038.
31. Meng, Q., Rayala, S.K., Gururaj, A.E., Talukder, A.H., O'Malley, B.W., and Kumar, R. (2007) Signaling-dependent and coordinated regulation of transcription, splicing, and translation resides in a single coregulator, PCBP1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5866–5871, doi: 10.1073/pnas.0701065104.
32. Zhang, T., Huang, X.H., Dong, L., Hu, D., Ge, C., Zhan, Y.Q., Xu, W.X., Yu, M., Li, W., Wang, X., Tang, L., Li, C.Y., and Yang, X.M. (2010) PCBP-1 regulates alternative splicing of the *CD44* gene and inhibits invasion in human hepatoma cell line HepG2 cells, *Mol. Cancer*, **9**, 72, doi: 10.1186/1476-4598-9-72.
33. 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., and Yang, X.M. (2012) THAP11, a novel binding protein of PCBP1, negatively regulates CD44 alternative splicing and cell invasion in a human hepatoma cell line, *FEBS Lett.*, **586**, 1431–1438, doi: 10.1016/j.febslet.2012.04.016.
34. Bomsztyk, K., Denisenko, O., and Ostrowski, J. (2004) hnRNP K: one protein multiple processes, *Bioessays*, **26**, 629–638, doi: 10.1002/bies.20048.
35. Mikula, M., Dzwonek, A., Karczmarski, J., Rubel, T., Dadlez, M., Wyrwicz, L.S., Bomsztyk, K., and Ostrowski, J. (2006) Landscape of the hnRNP K protein-protein interactome, *Proteomics*, **6**, 2395–2406, doi: 10.1002/pmic.200500632.
36. Expert-Bezancon, A., Le Caer, J.P., and Marie, J. (2002) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) K is a component of an intronic splicing enhancer complex that activates the splicing of the alternative exon 6A from chicken beta-tropomyosin pre-mRNA, *J. Biol. Chem.*, **277**, 16614–16623, doi: 10.1074/jbc.M201083200.
37. Cao, W., Razanau, A., Feng, D., Lobo, V.G., and Xie, J. (2012) Control of alternative splicing by forskolin through hnRNP K during neuronal differentiation, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 8059–8071, doi: 10.1093/nar/gks504.
38. Vénables, J.P., Koh, C.S., Froehlich, U., Lapointe, E., Couture, S., Inkel, L., Bramard, A., Paquet, E.R., Wätier, V., Durand, M., Lucier, J.F., Gervais-Bird, J., Tremblay, K., Prinos, P., Klinck, R., Elela, S.A., and Chabot, B. (2008) Multiple and specific mRNA processing targets for the major human hnRNP proteins, *Mol. Cell Biol.*, **28**, 6033–6043, doi: 10.1128/MCB.00726-08.
39. Weiss, I.M., and Liebhaber, S.A. (1995) Erythroid cell-specific mRNA stability elements in the alpha 2-globin 3'-non-translated region, *Mol. Cell Biol.*, **15**, 2457–2465.
40. Wang, X., Kiledjian, M., Weiss, I.M., and Liebhaber, S.A. (1995) Detection and characterization of a 3'-untranslated region ribonucleoprotein complex associated with human alpha-globin mRNA stability, *Mol. Cell Biol.*, **15**, 1769–1777.
41. Ren, C., Cho, S.J., Jung, Y.S., and Chen, X. (2014) DNA polymerase eta is regulated by poly(rC)-binding protein 1 via mRNA stability, *Biochem. J.*, **464**, 377–386, doi: 10.1042/BJ20141164.
42. Hwang, C.K., Wagley, Y., Law, P.Y., Wei, L.N., and Loh, H.H. (2017) Phosphorylation of poly(rC) binding protein 1 (PCBP1) contributes to stabilization of mu opioid receptor (MOR) mRNA via interaction with AU-rich element RNA-binding protein 1 (AUF1) and poly A binding protein (PABP), *Gene*, **598**, 113–130, doi: 10.1016/j.gene.2016.11.003.
43. Song, K.Y., Choi, H.S., Law, P.Y., Wei, L.N., and Loh, H.H. (2017) Post-transcriptional regulation of the human mu-opioid receptor (MOR) by morphine-induced RNA binding proteins hnRNP K and PCBP1, *J. Cell Physiol.*, **232**, 576–584, doi: 10.1002/jcp.25455.
44. Shi, H., Li, H., Yuan, R., Guan, W., Zhang, X., Zhang, S., Zhang, W., Tong, F., Li, L., Song, Z., Wang, C., Yang, S., and Wang, H. (2018) PCBP1 depletion promotes tumorigenesis through attenuation of p27(Kip1) mRNA stability and translation, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **37**, 187, doi: 10.1186/s13046-018-0840-1.
45. Vidaki, M., Drees, F., Saxena, T., Lanslots, E., Taliaferro, M.J., Tatarakis, A., Burge, C.B., Wang, E.T., and Gertler, F.B. (2017) A requirement for Mena, an actin regulator, in local mRNA translation in developing neurons, *Neuron*, **95**, 608–622.e605, doi: 10.1016/j.neuron.2017.06.048.
46. Lee, S.J., Osos-Prieto, J.A., Kawaguchi, R., Sahoo, P.K., Kar, A.N., Rozenbaum, M., Oliver, D., Chand, S., Ji, H., Shtutman, M., Miller-Randolph, S., Taylor, R.J., Fainzilber, M., Coppola, G., Burlingame, A.L., and Twiss, J.L. (2018) hnRNPs interacting with mRNA localization motifs define axonal RNA regulons, *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, 2091–2106, doi: 10.1074/mcp.RA118.000603.
47. Leal, G., Comprido, D., de Luca, P., Morais, E., Rodrigues, L., Mele, M., Santos, A.R., Costa, R.O., Pinto, M.J., Patil, S., Berentsen, B., Afonso, P., Carreto, L., Li, K.W., Pinheiro, P., Almeida, R.D., Santos, M.A.S., Bramham, C.R., and Duarte, C.B. (2017) The RNA-binding protein hnRNP K mediates the effect of BDNF on dendritic mRNA metabolism and regulates synaptic NMDA receptors in hippocampal neurons, *eNeuro*, **4**, doi: 10.1523/ENEURO.0268-17.2017.
48. Chakraborty, A., Mukherjee, S., Saha, S., De, S., and Sengupta Bandyopadhyay, S. (2017) Phorbol-12-myristate-13-acetate-mediated stabilization of leukemia

- inhibitory factor (IIF) mRNA: involvement of Nucleolin and PCBP1, *Biochem. J.*, **474**, 2349–2363, doi: 10.1042/BCJ20170051.
49. Tang, Y.S., Khan, R.A., Xiao, S., Hansen, D.K., Stabler, S.P., Kusumanchi, P., Jayaram, H.N., and Antony, A.C. (2017) Evidence favoring a positive feedback loop for physiologic auto upregulation of hnRNP-E1 during prolonged folate deficiency in human placental cells, *J. Nutr.*, **147**, 482–498, doi: 10.3945/jn.116.241364.
 50. Zhang, Y., Si, Y., Ma, N., and Mei, J. (2015) The RNA-binding protein PCBP2 inhibits Ang II-induced hypertrophy of cardiomyocytes through promoting GPR56 mRNA degeneration, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **464**, 679–684, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.139.
 51. Holcik, M., and Liebhaber, S.A. (1997) Four highly stable eukaryotic mRNAs assemble 3'-untranslated region RNA-protein complexes sharing *cis* and *trans* components, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2410–2414.
 52. Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Wilm, M., Thiele, B.J., Mann, M., and Hentze, M.W. (1997) mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3'-end, *Cell*, **89**, 597–606, doi: 10.1016/S0030-6657(08)70226-9.
 53. Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Shatsky, I.N., and Hentze, M.W. (2001) Lipoxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: the 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining, *Cell*, **104**, 281–290, doi: 10.1016/S0968-0004(05)00043-5.
 54. Collier, B., Goobar-Larsson, L., Sokolowski, M., and Schwartz, S. (1998) Translational inhibition *in vitro* of human papillomavirus type 16 L2 mRNA mediated through interaction with heterogeneous ribonucleoprotein K and poly(rC)-binding proteins 1 and 2, *J. Biol. Chem.*, **273**, 22648–22656.
 55. Chaudhury, A., Hussey, G.S., Ray, P.S., Jin, G., Fox, P.L., and Howe, P.H. (2010) TGF-beta-mediated phosphorylation of hnRNP E1 induces EMT via transcript-selective translational induction of Dab2 and ILE1, *Nat. Cell Biol.*, **12**, 286–293, doi: 10.1038/ncb2029.
 56. Evans, J.R., Mitchell, S.A., Spriggs, K.A., Ostrowski, J., Bomsztyk, K., Ostarek, D., and Willis, A.E. (2003) Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment *in vitro* and *in vivo*, *Oncogene*, **22**, 8012–8020, doi: 10.1038/sj.onc.1206645.
 57. Blyn, L.B., Towner, J.S., Semler, B.L., and Ehrenfeld, E. (1997) Requirement of poly(rC) binding protein 2 for translation of poliovirus RNA, *J. Virol.*, **71**, 6243–6246.
 58. Ogram, S.A., Spear, A., Sharma, N., and Flanagan, J.B. (2010) The 5'CL-PCBP RNP complex, 3' poly(A) tail and 2A(pro) are required for optimal translation of poliovirus RNA, *Virology*, **397**, 14–22, doi: 10.1016/j.virol.2009.11.006.
 59. Gamarnik, A.V., and Andino, R. (1997) Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5' noncoding region of poliovirus RNA, *RNA*, **3**, 882–892.
 60. Pickering, B.M., Mitchell, S.A., Evans, J.R., and Willis, A.E. (2003) Polypyrimidine tract binding protein and poly (rC) binding protein 1 interact with the BAG-1 IRES and stimulate its activity *in vitro* and *in vivo*, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 639–646.
 61. Naphine, S., Treffers, E.E., Bell, S., Goodfellow, I., Fang, Y., Firth, A.E., Snijder, E.J., and Brierley, I. (2016) A novel role for poly(C) binding proteins in programmed ribosomal frameshifting, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 5491–5503, doi: 10.1093/nar/gkw480.
 62. Bogdan, A.R., Miyazawa, M., Hashimoto, K., and Tsuji, Y. (2016) Regulators of iron homeostasis: new players in metabolism, cell death, and disease, *Trends Biochem. Sci.*, **41**, 274–286, doi: 10.1016/j.tibs.2015.11.012.
 63. Dixon, S.J., and Stockwell, B.R. (2014) The role of iron and reactive oxygen species in cell death, *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 9–17, doi: 10.1038/nchembio.
 64. Torti, S.V., and Torti, F.M. (2013) Iron and cancer: more ore to be mined, *Nat. Rev. Cancer*, **13**, 342–355, doi: 10.1038/nrc3495.
 65. Nandal, A., Ruiz, J.C., Subramanian, P., Ghimire-Rijal, S., Sinnamon, R.A., Stemmler, T.L., Bruick, R.K., and Philpott, C.C. (2011) Activation of the HIF prolyl hydroxylase by the iron chaperones PCBP1 and PCBP2, *Cell Metab.*, **14**, 647–657, doi: 10.1016/j.cmet.2011.08.015.
 66. Frey, A.G., Nandal, A., Park, J.H., Smith, P.M., Yabe, T., Ryu, M.S., Ghosh, M.C., Lee, J., Rouault, T.A., Park, M.H., and Philpott, C.C. (2014) Iron chaperones PCBP1 and PCBP2 mediate the metallation of the dinuclear iron enzyme deoxyhypusine hydroxylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 8031–8036, doi: 10.1073/pnas.1402732111.
 67. Yanatori, I., Richardson, D.R., Toyokuni, S., and Kishi, F. (2017) The iron chaperone poly(rC)-binding protein 2 forms a metabolon with the heme oxygenase 1/cytochrome P450 reductase complex for heme catabolism and iron transfer, *J. Biol. Chem.*, **292**, 13205–13229, doi: 10.1074/jbc.M117.776021.
 68. Wang, Z., Yin, W., Zhu, L., Li, J., Yao, Y., Chen, F., Sun, M., Zhang, J., Shen, N., Song, Y., and Chang, X. (2018) Iron drives T helper cell pathogenicity by promoting RNA-binding protein PCBP1-mediated proinflammatory cytokine production, *Immunity*, **49**, 80–92 e87, doi: 10.1016/j.immuni.2018.05.008.
 69. Yanatori, I., Yasui, Y., Tabuchi, M., and Kishi, F. (2014) Chaperone protein involved in transmembrane transport of iron, *Biochem. J.*, **462**, 25–37, doi: 10.1042/BJ20140225.
 70. Yanatori, I., Richardson, D.R., Imada, K., and Kishi, F. (2016) Iron export through the transporter ferroportin 1 is modulated by the iron chaperone PCBP2, *J. Biol. Chem.*, **291**, 17303–17318, doi: 10.1074/jbc.M116.721936.
 71. Mikula, M., Bomsztyk, K., Goryca, K., Chojnowski, K., and Ostrowski, J. (2013) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (HnRNP) K genome-wide binding survey reveals its role in regulating 3'-end RNA processing and transcription termination at the early growth response 1 (EGR1) gene through XRN2 exonuclease, *J. Biol. Chem.*, **288**, 24788–24798, doi: 10.1074/jbc.M113.496679.
 72. Pintacuda, G., Wei, G., Roustan, C., Kirmizitas, B.A., Solcan, N., Cerase, A., Castello, A., Mohammed, S., Moindrot, B., Nesterova, T.B., and Brockdorff, N. (2017) hnRNPK recruits PCGF3/5-PRC1 to the Xist RNA B-repeat to establish polycomb-mediated chromosomal silencing, *Mol. Cell*, **68**, 955–969, e910, doi: 10.1016/j.molcel.2017.11.013.
 73. Ishii, T., Hayakawa, H., Igawa, T., Sekiguchi, T., and Sekiguchi, M. (2018) Specific binding of PCBP1 to heavily oxidized RNA to induce cell death, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 6715–6720, doi: 10.1073/pnas.1806912115.
 74. Carpenter, B., McKay, M., Dundas, S.R., Lawrie, L.C., Telfer, C., and Murray, G.I. (2006) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly localised and is associated with poor prognosis in colorectal cancer, *Br. J. Cancer*, **95**, 921–927, doi: 10.1038/sj.bjc.6603349.
 75. Chen, L.C., Chung, I.C., Hsueh, C., Tsang, N.M., Chi, L.M., Liang, Y., Chen, C.C., Wang, L.J., and Chang, Y.S. (2010) The antiapoptotic protein, FLIP, is regulated by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and correlates with poor overall survival of nasopharyngeal carcinoma patients, *Cell Death Differ.*, **17**, 1463–1473, doi: 10.1038/cdd.2010.24.
 76. Ciarlo, M., Benelli, R., Barbieri, O., Minghelli, S., Barboro, P., Balbi, C., and Ferrari, N. (2012) Regulation of neuroendocrine differentiation by AKT/hnRNPK/AR/beta-catenin signaling in prostate cancer cells, *Int. J. Cancer*, **131**, 582–590, doi: 10.1002/ijc.26402.

77. Wen, F., Shen, A., Shanas, R., Bhattacharyya, A., Lian, F., Hostetter, G., and Shi, J. (2010) Higher expression of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein k in melanoma, *Ann. Surg. Oncol.*, **17**, 2619–2627, doi: 10.1245/s10434-010-1121-1.
78. Wu, C.S., Chang, K.P., Chen, L.C., Chen, C.C., Liang, Y., Hseuh, C., and Chang, Y.S. (2012) Heterogeneous ribonucleoprotein K and thymidine phosphorylase are independent prognostic and therapeutic markers for oral squamous cell carcinoma, *Oral Oncol.*, **48**, 516–522, doi: 10.1016/j.oraloncology.
79. Chen, X., Gu, P., Xie, R., Han, J., Liu, H., Wang, B., Xie, W., Xie, W., Zhong, G., Chen, C., Xie, S., Jiang, N., Lin, T., and Huang, J. (2017) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is associated with poor prognosis and regulates proliferation and apoptosis in bladder cancer, *J. Cell Mol. Med.*, **21**, 1266–1279, doi: 10.1111/jcmm.12999.
80. Kawasaki, Y., Komiya, M., Matsumura, K., Negishi, L., Suda, S., Okuno, M., Yokota, N., Osada, T., Nagashima, T., Hiyoshi, M., Okada-Hatakeyama, M., Kitayama, J., Shirahige, K., and Akiyama, T. (2016) MYU, a target lncRNA for Wnt/c-Myc signaling, mediates induction of CDK6 to promote cell cycle progression, *Cell Rep.*, **16**, 2554–2564, doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.015.
81. Shin, C.H., Lee, H., Kim, H.R., Choi, K.H., Joung, J.G., and Kim, H.H. (2017) Regulation of PLK1 through competition between hnRNPK, miR-149-3p and miR-193b-5p, *Cell Death Differ.*, **24**, 1861–1871, doi: 10.1038/cdd.2017.106.
82. Zhu, X.H., Wang, J.M., Yang, S.S., Wang, F.F., Hu, J.L., Xin, S.N., Men, H., Lu, G.F., Lan, X.L., Zhang, D., Wang, X.Y., Liao, W.T., Ding, Y.Q., and Liang, L. (2017) Down-regulation of DAB2IP promotes colorectal cancer invasion and metastasis by translocating hnRNPK into nucleus to enhance the transcription of MMP2, *Int. J. Cancer*, **141**, 172–183, doi: 10.1002/ijc.30701.
83. Zhao, S., Feng, J., Wang, Q., Tian, L., Zhang, Y., and Li, H. (2018) hnRNP K plays a protective role in TNF-alpha-induced apoptosis in podocytes, *Biosci. Rep.*, **38**, BSR20180288, doi: 10.1042/BSR20180288.
84. Kim, T., Jeon, Y.J., Cui, R., Lee, J.H., Peng, Y., Kim, S.H., Tili, E., Alder, H., and Croce, C.M. (2015) Role of MYC-regulated long noncoding RNAs in cell cycle regulation and tumorigenesis, *J. Natl. Cancer Inst.*, **107**, doi: 10.1093/jnci/dju505
85. Huang, H., Han, Y., Yang, X., Li, M., Zhu, R., Hu, J., Zhang, X., Wei, R., Li, K., and Gao, R. (2017) HNRNPK inhibits gastric cancer cell proliferation through p53/p21/CCND1 pathway, *Oncotarget*, **8**, 103364–103374, doi: 10.18632/oncotarget.21873.
86. Gallardo, M., Lee, H.J., Zhang, X., Bueso-Ramos, C., Paeon, L.R., McArthur, M., Multani, A., Nazha, A., Manshour, T., Parker-Thornburg, J., Rapado, I., Quintas-Cardama, A., Kornblau, S.M., Martinez-Lopez, J., and Post, S.M. (2015) hnRNP K is a haploinsufficient tumor suppressor that regulates proliferation and differentiation programs in hematologic malignancies, *Cancer Cell*, **28**, 486–499, doi: 10.1016/j.ccell.2015.09.001.
87. Enge, M., Bao, W., Hedstrom, E., Jackson, S.P., Moumen, A., and Selivanova, G. (2009) MDM2-dependent down-regulation of p21 and hnRNP K provides a switch between apoptosis and growth arrest induced by pharmacologically activated p53, *Cancer Cell*, **15**, 171–183, doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.019.
88. Moumen, A., Masterson, P., O'Connor, M.J., and Jackson, S.P. (2005) hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage, *Cell*, **123**, 1065–1078, doi: 10.1016/j.cell.2005.09.032.
89. Shnyreva, M., Schullery, D.S., Suzuki, H., Higaki, Y., and Bomsztyk, K. (2000) Interaction of two multifunctional proteins. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and Y-box-binding protein, *J. Biol. Chem.*, **275**, 15498–15503, doi: 10.1074/jbc.275.20.15498.
90. Dimitrova, N., Zamudio, J.R., Jong, R.M., Soukup, D., Resnick, R., Sarma, K., Ward, A. J., Raj, A., Lee, J.T., Sharp, P.A., and Jacks, T. (2014) LincRNA-p21 activates p21 in cis to promote Polycomb target gene expression and to enforce the G1/S checkpoint, *Mol. Cell*, **54**, 777–790, doi: 10.1016/j.molcel.2014.04.025.
91. Huarte, M., Guttman, M., Feldser, D., Garber, M., Koziol, M.J., Kenzelmann-Broz, D., Khalil, A.M., Zuk, O., Amit, I., Rabani, M., Attardi, L.D., Regev, A., Lander, E.S., Jacks, T., and Rinn, J.L. (2010) A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response, *Cell*, **142**, 409–419, doi: 10.1016/j.cell.2010.06.040.
92. Denisenko, O.N., and Bomsztyk, K. (1997) The product of the murine homolog of the Drosophila extra sex combs gene displays transcriptional repressor activity, *Mol. Cell Biol.*, **17**, 4707–4717.
93. Waggoner, S.A., Johannes, G.J., and Liebhaber, S.A. (2009) Depletion of the poly(C)-binding proteins alphaCP1 and alphaCP2 from K562 cells leads to p53-independent induction of cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN1A) and G1 arrest, *J. Biol. Chem.*, **284**, 9039–9049, doi: 10.1074/jbc.M806986200.
94. Link, L.A., Howley, B.V., Hussey, G.S., and Howe, P.H. (2016) PCBP1/HNRNP E1 protects chromosomal integrity by translational regulation of CDC27, *Mol. Cancer Res.*, **14**, 634–646, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0018.
95. Ji, X., Humenik, J., Yang, D., and Liebhaber, S.A. (2018) PolyC-binding proteins enhance expression of the CDK2 cell cycle regulatory protein via alternative splicing, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 2030–2044, doi: 10.1093/nar/gkx1255.
96. Zhang, Y., Meng, L., Xiao, L., Liu, R., Li, Z., and Wang, Y.L. (2018) The RNA-binding protein PCBP1 functions as a tumor suppressor in prostate cancer by inhibiting mitogen activated protein kinase 1, *Cell Physiol. Biochem.*, **48**, 1747–1754, doi: 10.1159/000492315.
97. Ji, F.J., Wu, Y.Y., An, Z., Liu, X.S., Jiang, J.N., Chen, F.F., and Fang, X.D. (2017) Expression of both poly r(C) binding protein 1 (PCBP1) and miRNA-3978 is suppressed in peritoneal gastric cancer metastasis, *Sci. Rep.*, **7**, 15488, doi: 10.1038/s41598-017-15448-9.
98. Grelet, S., Link, L.A., Howley, B., Obellianne, C., Palanisamy, V., Gangaraju, V.K., Diehl, J.A., and Howe, P.H. (2017) A regulated PNUITS mRNA to lncRNA splice switch mediates EMT and tumour progression, *Nat. Cell Biol.*, **19**, 1105–1115, doi: 10.1038/ncb359.
99. Zhang, W., Shi, H., Zhang, M., Liu, B., Mao, S., Li, L., Tong, F., Liu, G., Yang, S., and Wang, H. (2016) Poly C binding protein 1 represses autophagy through downregulation of LC3B to promote tumor cell apoptosis in starvation, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **73**, 127–136, doi: 10.1016/j.biocel.2016.02.009.
100. Li, J., Feng, Q., Wei, X., and Yu, Y. (2016) MicroRNA-490 regulates lung cancer metastasis by targeting poly r(C)-binding protein 1, *Tumour Biol.*, **37**, 15221–15228, doi: 10.1007/s13277-016-5347-9.
101. Huo, L.R., Ju, W., Yan, M., ZJou, J.H., Yan, W., He, B., Zhao, X.L., Jenkins, E.C., Brown, W.T., and Zhong, N. (2010) Identification of differentially expressed transcripts and translators targeted by knock-down of endogenous PCBP1, *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 1954–1964, doi: 10.1016/j.bbapap.2010.07.002.
102. Tripathi, V., and Zhang, Y.E. (2017) Redirecting RNA splicing by SMAD3 turns TGF-beta into a tumor promoter, *Mol. Cell Oncol.*, **4**, e1265699, doi: 10.1080/23723556.2016.1265699.

103. Howley, B.V., Hussey, G.S., Link, L.A., and Howe, P.H. (2016) Translational regulation of inhibin betaA by TGFbeta via the RNA-binding protein hnRNP E1 enhances the invasiveness of epithelial-to-mesenchymal transitioned cells, *Oncogene*, **35**, 1725–1735, doi: 10.1038/onc.2015.238.
104. Zhang, P., Wang, N., Lin, X., Jin, L., Xu, H., Li, R., and Huang, H. (2016) Expression and localization of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in mouse ovaries and preimplantation embryos, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **471**, 260–265, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.02.003.
105. 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., and Rana, T.M. (2014) An evolutionarily conserved long noncoding RNA TUNA controls pluripotency and neural lineage commitment, *Mol. Cell*, **53**, 1005–1019, doi: 10.1016/j.molcel.2014.01.021.
106. Bao, X., Wu, H., Zhu, X., Guo, X., Hutchins, A.P., Luo, Z., Song, H., Chen, Y., Lai, K., Yin, M., Xu, L., Zhou, L., Chen, J., Wang, D., Qin, B., Frampton, J., Tse, H.F., Pei, D., Wang, H., Zhang, B., and Esteban, M.A. (2015) The p53-induced lincRNA-p21 derails somatic cell reprogramming by sustaining H3K9me3 and CpG methylation at pluripotency gene promoters, *Cell Res.*, **25**, 80–92, doi: 10.1038/cr.2014.165.
107. Chia, N.Y., Chan, Y.S., Feng, B., Lu, X., Orlov, Y.L., Moreau, D., Kumar, P., Yang, L., Jiang, J., Lau, M.S., Huss, M., Soh, B.S., Kraus, P., Li, P., Lufkin, T., Lim, B., Clarke, N.D., Bard, F., and Ng, H.H. (2010) A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity, *Nature*, **468**, 316–320, doi: 10.1038/nature09531.
108. Ding, L., Paszkowski-Rogacz, M., Nitzsche, A., Slabicki, M.M., Heninger, A.K., de Vries, I., Kittler, R., Junqueira, M., Shevchenko, A., Schulz, H., Hubner, N., Doss, M.X., Sachinidis, A., Hescheler, J., Iacone, R., Anastasiadis, K., Stewart, A.F., Pisabarro, M.T., Caldarelli, A., Poser, I., Theis, M., and Buchholz, F. (2009) A genome-scale RNAi screen for Oct4 modulators defines a role of the Paf1 complex for embryonic stem cell identity, *Cell Stem Cell*, **4**, 403–415, doi: 10.1016/j.stem.2009.03.009.
109. Thompson, P.J., Dulberg, V., Moon, K.M., Foster, L.J., Chen, C., Karimi, M.M., and Lorincz, M.C. (2015) hnRNP K coordinates transcriptional silencing by SETDB1 in embryonic stem cells, *PLoS Genet.*, **11**, e1004933, doi: 10.1371/journal.pgen.1004933.
110. Fujikura, J., Yamato, E., Yonemura, S., Hosoda, K., Masui, S., Nakao, K., Miyazaki Ji, J., and Niwa, H. (2002) Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors, *Genes Dev.*, **16**, 784–789, doi: 10.1101/gad.968802.
111. Nika, E., Brugnoli, F., Piazzini, M., Lambertini, E., Grassilli, S., Bavelloni, A., Piva, R., Capitani, S., and Bertagnolo, V. (2014) hnRNP K in PU.1-containing complexes recruited at the CD11b promoter: a distinct role in modulating granulocytic and monocytic differentiation of AML-derived cells, *Biochem. J.*, **463**, 115–122, doi: 10.1042/BJ20140358.
112. Fan, X., Xiong, H., Wei, J., Gao, X., Feng, Y., Liu, X., Zhang, G., He, Q.Y., Xu, J., and Liu, L. (2015) Cytoplasmic hnRNPK interacts with GSK3beta and is essential for the osteoclast differentiation, *Sci. Rep.*, **5**, 17732, doi: 10.1038/srep17732.
113. Shi, Z., Zhao, C., Yang, Y., Teng, H., Guo, Y., Ma, M., Guo, X., Zhou, Z., Huo, R., and Zhou, Q. (2015) Maternal PCBP1 determines the normal timing of pronucleus formation in mouse eggs, *Cell. Mol. Life Sci.*, **72**, 3575–3586, doi: 10.1007/s00018-015-1905-3.
114. Xia, M., He, H., Wang, Y., Liu, M., Zhou, T., Lin, M., Zhou, Z., Huo, R., Zhou, Q., and Sha, J. (2012) PCBP1 is required for maintenance of the transcriptionally silent state in fully grown mouse oocytes, *Cell Cycle*, **11**, 2833–2842, doi: 10.4161/cc.21169.
115. Ghanem, L.R., Kromer, A., Silverman, I.M., Chatterji, P., Traxler, E., Penzo-Mendez, A., Weiss, M.J., Stanger, B.Z., and Liebhauer, S.A. (2015) The Poly(C) binding protein Pcbp2 and its retrotransposed derivative Pcbp1 are independently essential to mouse development, *Mol. Cell Biol.*, **36**, 304–319, doi: 10.1128/MCB.00936-15.
116. Espinoza-Lewis, R.A., Yang, Q., Liu, J., Huang, Z.P., Hu, X., Chen, D., and Wang, D.Z. (2017) Poly(C)-binding protein 1 (Pcbp1) regulates skeletal muscle differentiation by modulating microRNA processing in myoblasts, *J. Biol. Chem.*, **292**, 9540–9550, doi: 10.1074/jbc.M116.773671.
117. Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., and Saitou, M. (2011) Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells, *Cell*, **146**, 519–532, doi: 10.1016/j.cell.2011.06.052.
118. Chen, Q., Cai, Z.K., Chen, Y.B., Gu, M., Zheng, D.C., Zhou, J., and Wang, Z. (2015) Poly r(C) binding protein-1 is central to maintenance of cancer stem cells in prostate cancer cells, *Cell Physiol. Biochem.*, **35**, 1052–1061, doi: 10.1159/000373931.

THE KH-DOMAIN POLY(C)-BINDING PROTEINS AS VERSATILE REGULATORS OF MULTIPLE BIOLOGICAL PROCESSES

I. B. Nazarov*, E. I. Bakhmet, and A. N. Tomilin

Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, 194064 St. Petersburg, Russia; E-mail: i.nazarov@incras.ru

Received October 16, 2018

Revised November 10, 2018

Accepted November 21, 2018

Five known members of the family of KH-domain-containing poly(C)-binding proteins (Pcbp1–4, hnRNP-K) possess an unusually broad spectrum of cellular functions that include the regulation of gene transcription, pre-mRNA processing, splicing, stability, translational silencing and enhancement, the control of iron turnover and many others. Mechanistically, these proteins act via binding to nucleic acids and protein–protein interactions. Through performing these multiple functions, the KH-domain-containing poly(C)-binding proteins are involved in a wide variety of biological processes such as embryonic development, cell differentiation, and cancer. Dysregulation of the KH-domain-containing protein expression is frequently associated with severe developmental defects and neoplasia. This review summarizes progress in studies of the KH-domain-containing proteins made over past two decades. The review also reports our recent finding implying an involvement of the KH-factor Pcbp1 in the control of transition from naive to primed pluripotency state.

Keywords: Pcbp1–4, hnRNP-K, gene expression, cell cycle, cancer, embryonic development, pluripotent stem cells