Успехи биологической химии, т. 60, 2020, с. 3-42

# БЕЛКИ С ДОМЕНОМ ХОЛОДОВОГО ШОКА: СТРУКТУРА И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

# ©2020 г. К. С. БУДКИНА<sup>1</sup>, Н. Е. ЗЛОБИН<sup>2</sup>, С. В. КОНОНОВА<sup>1</sup>, Л. П. ОВЧИННИКОВ<sup>1</sup>, А. В. БАБАКОВ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт белка РАН, Пущино, Московская область <sup>2</sup>ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАН, Москва

I. Введение. II. Белки холодового шока прокариот. III. Белки эукариот с доменом холодового шока. IV. YB-белки. V. Lin28. VI. Белки с CSD растений. VII. Заключение.

# **І. ВВЕДЕНИЕ**

Почти 2% белков, закодированных в человеческом геноме, обладают двойной ДНК- и РНК-связывающей способностью. Белки такого рода играют ключевую роль в регуляции экспрессии генов, выживании клеток и гомеостазе [1]. В эту группу входят белки, содержащие домен холодового шока (CSD). Белки с этим доменом обнаруженыв представителях различных таксономических групп, как в прокариотах, так и в эукариотах.

Основу структуры CSD составляют пять антипараллельных β-тяжей, образующих компактную укладку типа β-баррель. На тяжах β2 и β3 расположены PHK-связывающие мотивы RNP1 и RNP2 [2].

Принятые сокращения: CSD – cold shock domain (домен холодового шока); CSP – белки холодового шока; мРНП – матричные рибонуклеопротеиды; НТО – нетранслируемая область; А/Р домен – аланин/пролин-богатый домен; CRS – cytoplasmic retention site (сайт удержания в цитоплазме); CTD – C-terminal domain (C-концевой домен); NLS – nuclear localization signal (сигнал ядерной локализации); ZnF – «цинковый палец»; YB-1 – Y-box binding protein 1 (Y-бокс-связывающий белок 1); АК – аминокислотный; оцДНК – одноцепочечная ДНК; дцДНК – двухцепочечная ДНК; оцРНК – одноцепочечная РНК.

Адрес для корреспонденции: ovchinn@vega.protres.ru

Работа выполнена в рамках государственного задания № 0574-2019-0001 и поддержана грантом РНФ 19-74-20129 (раздел IV).

К.С.Будкина	и	соавт.
-------------	---	--------

Мотивы этого типа характерны для любых CSD, а также для доменов RRM-типа, имеющихся в различных белках, взаимодействующих с РНК [3]. Ароматические радикалы аминокислотных остатков, входящих в состав RNP1 и RNP2, обеспечивают взаимодействие CSD с нуклеиновыми кислотами за счет стэкинг-взаимодействий и имеют критическое значение для РНК-связывающей и РНК-плавящей активности белков с CSD [4]. Поверхность белковой молекулы, содержащая мотивы RNP1 и RNP2, включает в себя не только ароматические, но и множество основных положительно заряженных аминокислотных остатков. Общий положительный заряд, характерный для данного участка CSD, обеспечивает неспецифичное электростатическое взаимодействие с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновых кислот, в то время как ароматические боковые группы стабилизируют это взаимодействие за счет гидрофобных и стэкингвзаимодействий [4]. Кleene К.С., анализируя последовательности ряда эукариотических белков с CSD, выделил еще два РНК-связывающих мотива, первый из которых практически совпадает с β1-тяжем, а второй лежит в середине §3§4-петли [5].

Благодаря общей пространственной организации глобул прокариотических белков холодового шока, ароматические аминокислотные остатки оказываются расположенными в одной плоскости, образуя на поверхности белковой молекулы гидрофобный кластер необычно большого размера [6, 7].

# **II. БЕЛКИ ХОЛОДОВОГО ШОКА ПРОКАРИОТ**

# ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Происхождение названия CSD связано с историей его открытия при изучении адаптации бактерий к пониженной температуре.

Процесс адаптации прокариотического организма к снижению температуры среды лучше всего изучен на примере мезофильной бактерии *Escherichia coli*. Оптимальная температура роста *E. coli* составляет 37°С; температуры ниже 20°С являются для этого организма низкотемпературным стрессом. Наиболее очевидным последствием внезапного снижения температуры среды (холодового шока) является прекращение роста и деления клеток *E. coli* на срок 2–4 часа и более [8]. Было установлено, что холодовой шок вызывает практически полную остановку синтеза большинства белков, что и является основной причиной прекращения роста бактерий [9, 10]. В то же время, экспрессия некоторых белков поддерживается

на более высоком уровне, чем до возникновения неблагоприятных температурных условий [8–12]. При снижении температуры среды с 37°С до 15°С один из этих белков, получивший наименование CspA (Cold shock protein A), накапливается в количестве, достигающем 13% от общего пула клеточных белков, синтезируемых в этих условиях [13]. Структура этого белка представляет собой β-баррель, состоящий из пяти антипараллельных β-тяжей [14].

Белки, подобные CspA, были обнаружены в бактериях, относящихся к различным экологическим группам: психрофилам, психротрофам, мезофилам, термофилам и гипертермофилам [15]. Для некоторых из них показано участие в процессе адаптации бактерий к низкотемпературному стрессу. Вследствие этого, все подобные белки были названы белками холодового шока (cold shock protein, CSP), а структура, лежащая в основе каждого из подобных белков – доменом холодового шока (cold shock domain, CSD).

CSP обычно представлены в геномах прокариот не отдельными генами, а семействами гомологичных генов [16]. Семейство CSP *E. coli* состоит из 9 представителей, получивших наименования CspA – CspI. Заметная индукция экспрессии в условиях пониженной температуры среды установлена для CspA, CspB, CspG и CspI (в особенности для первых трех) [10, 17]. Белки CspC и CspE экспрессируются в клетках *E. coli* при 37°C [18, 19].

С помощью делеционного анализа было продемонстрировано, что функции CSP *E. coli* перекрываются, по крайней мере, в контексте низкотемпературной адаптации [20]. Так, штаммы, несущие делеции сразу по двум или трем генам – гомологам CspA ( $\Delta cspA\Delta cspB$ ,  $\Delta cspA\Delta cspG$ ,  $\Delta cspB\Delta cspG$ ,  $\Delta cspA\Delta cspI$ ,  $\Delta cspA\Delta cspB\Delta cspG$ ), сохраняли способность к росту при низкой температуре (15°C). В штамме  $\Delta cspA\Delta cspB\Delta cspG$  при снижении температуры наблюдалась сверхэкспрессия гена CspE. Перечисленные выше факты доказывают, что представители семейства CSP *E. coli* проявляют функциональную взаимозаменяемость и могут компенсировать отсутствие экспрессии одного или нескольких гомологов. Создать штамм *E. coli*, не растущий при пониженной температуре, удалось лишь делецией четырех генов семейства ( $\Delta cspA\Delta cspB\Delta cspG\Delta cspE$ ). При этом, чувствительность этого штамма к пониженной температуре может быть компенсирована путем сверхэкспрессии любого CSP *E. coli* за исключением CspD [20].

Все бактериальные CSP имеют общее строение. Для них характерны небольшой размер (67–73 АК остатков), а также отсутствие каких-либо дополнительных доменов, помимо CSD. С помощью ЯМР и рентгеноструктурного анализа были установлены трехмерные

К.С.Будкина и	і соавт.
---------------	----------

структуры ряда бактериальных СЅР, в частности СѕрА из *E. coli*, СѕрВ из *Bacillus subtilis*, СѕрВ из *Bacillus caldolyticus* и СѕрВ из *Thermotoga maritima* [6, 14, 21, 22]. При этом, несмотря на достаточно существенные различия в аминокислотной последовательности, пространственные структуры этих белков чрезвычайно схожи. Исследование трехмерной структуры молекулы СѕрА из *E. coli* подтвердило наличие на поверхности, составленной тяжами  $\beta 2$  и  $\beta 3$ , компактного гидрофобного кластера, содержащего ароматические аминокислотные остатки Phe18, Phe20, Phe31, His33 и Phe34. Остатки Phe18 и Phe20 входят в состав мотива RNP1, Phe31, His33 и Phe34 – в состав мотива RNP2 [23].

# ФУНКЦИИ ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ ХОЛОДОВОГО ШОКА

Все известные на данный момент функции CSP прокариот определяются взаимодействием с нуклеиновыми кислотами.

Взаимодействие CSP бактерий с нуклеиновыми кислотами активно исследовалось in vitro. Было установлено, что CspA из E. coli связывается с молекулами РНК с низким сродством, не проявляя при этом заметной специфичности по отношению к нуклеотидной последовательности [24]. Прочие представители семейства CSP из E. coli также способны связывать РНК и оцДНК, проявляя при этом несколько большую специфичность. Так, CspB с наибольшим сродством взаимодействует с мотивом UUUUU, CspC - с мотивом AGGGAGGGA, CspE избирательно связывает AU-богатые последовательности [25]. Белок CspB из бактерии B. subtilis проявляет повышенное сродство к Т-богатым последовательностям; в то же время, специфичность взаимодействия этого белка с молекулами нуклеиновых кислот довольно низка [26]. Для различных CSP прокариот показана способность не только связываться с молекулами нуклеиновых кислот, но и дестабилизировать имеющиеся в них вторичные структуры – так называемая плавящая активность [27, 28]. Частным случаем проявления CSP РНК-плавящей активности является антитерминация транскрипции. Взаимодействуя с терминаторными последовательностями, CSP дестабилизируют вторичные структуры и препятствуют терминации транскрипции [27, 29]. Антитерминаторная активность показана, например, для белка CspE, участвующего в поддержании высокого уровня экспрессии отдаленных от промотора генов в опероне metY-rpsO[29]. Доказано, что экспрессия некоторых генов, участвующих в адаптации бактериальных клеток к пониженным температурам, действительно активируется in vivo посредством механизма антитерминации [29].

Длинные одноцепочечные молекулы мРНК склонны образовывать разнообразные вторичные структуры, которые могут препятствовать продвижению рибосом, либо скрывать последовательность Шайна-Дальгарно, оказывая негативное влияние на процесс трансляции; масштаб данного явления возрастает при снижении температуры окружающей среды [30]. РНК-плавящая активность CSP способствует дестабилизации вторичных структур, нивелирует их неблагоприятное влияние на трансляцию и поддерживает бесперебойную работу белоксинтезирующего аппарата [24, 31–33]. Следует отметить, что из-за низкого сродства CSP к мРНК, молекулы этих белков по всей видимости не создают существенных препятствий на пути продвижения рибосом при трансляции [32].

Вовлеченность СSP в дестабилизацию вторичных структур на клеточных мРНК была показана в *E. coli* [12]. Делеция гена белка СspA вызывала при пониженной температуре снижение общей эффективности трансляции на 30–40%. Дополнительные делеции генов других CSP *E. coli* (CspB, CspE, CspG) приводили к практически полной утрате способности к трансляции. Необходимость CSP для акклиматизации может определяться способностью дестабилизировать вторичные структуры мРНК, поскольку в мутанте с четырьмя делециями ( $\Delta cspA\Delta cspB\Delta cspE\Delta cspG$ ) молекулы мРНК при пониженной температуре были высоко структурированными. Любопытно, что мутант с пятью делециями ( $\Delta cspA\Delta cspB\Delta cspC\Delta cspE\Delta cspG$ ) делился несколько медленнее *E. coli* «дикого типа» даже при температуре 37°C [12].

Помимо общего повышения эффективности трансляции, CSP способны влиять на стабильность мРНК, регулируя их деградацию [31]. В частности, CspC и CspE из *E. coli* играют роль в стабилизации мРНК таких белков, как общий регулятор стрессового ответа RpoS и универсальный белок стрессового ответа UspA [34]. CspE взаимодействует с поли(А)-концами мРНК и препятствует деградации мРНК при обработке РНКазами PNPase и RNaseE [35].

Таким образом, за счет различных механизмов CSP прокариот регулируют синтез различных клеточных белков как при пониженных значениях температуры, так и в температурных условиях, оптимальных для роста бактериальных клеток.

# III. БЕЛКИ ЭУКАРИОТ С ДОМЕНОМ ХОЛОДОВОГО ШОКА Обшая характеристика

Белки, содержащие CSD, характерны не только для бактерий, но и для многоклеточных организмов, принадлежащих к различным царствам. При этом если белки холодового шока прокариот практически всегда состоят только из CSD, то белки эукариот обычно имеют в своем составе дополнительные домены. Вследствие этого, эукариотические белки часто именуются белками с CSD, что подчеркивает их мультидоменную природу. Эукариотические белки, состоящие исключительно из CSD, немногочисленны. При этом существуют белки с этим доменом в одной копии (Clah8 из *Cladosporium herbarum* и zfY1 из *Danio rerio*) и белки с несколькими повторяющимися CSD, разделенными линкерными последовательностями (например, UNR/ CSDEI, обнаруженный у позвоночных организмов)[36–38].

Дополнительные домены, входящие в состав белков с CSD, разнообразны. В этом обзоре будут рассмотрены белки с глицин-богатыми последовательностями, доменами «цинковые пальцы» ССНС-типа, протяженными доменами, состоящими из чередующихся кластеров положительно и отрицательно заряженных АК остатков в различных сочетаниях друг с другом (рис. 1). Наличие дополнительных неупорядоченных доменов в белках с CSD повышает полифункциональность этих белков [39] и позволяет им выполнять организующую роль при формировании различных функциональных комплексов, в том числе и в таких немембранных структурах, как тельца процессинга (Р-тельца) и стресс-гранулы [40].

Пространственная структура CSD практически идентична структуре белков прокариот, представляя собой β-баррель из пяти β-тяжей. Основным различием является большая длина и AK состав участка, соединяющего тяжи β3 и β4, в эукариотических белках по сравнению с прокариотическими [41].



Рис. 1. Доменная организация белков с CSD с дополнительными доменами и без них.

# **IV. ҮВ-БЕЛКИ**

Обширное семейство белков позвоночных с CSD получило название Y-бокс связывающие белки (YB-белки). Оно включает три подсемейства белков, кодирующихся генами YBX1, YBX2 и YBX3 [42]. Примечательно, что после транскрипции гена YBX3 посредством альтернативного сплайсинга образуются две мРНК, которые являются матрицами для биосинтеза двух изоформ белка YB-3 – длинной и короткой [5].

Все YB-белки являются основными (pI = 9,5–10,7) и состоят из структурированного CSD и двух неупорядоченных доменов – N-концевого, богатого Pro и Ala (A/P домен), и C-концевого домена (CTD), содержащего четыре Arg-богатых кластера, которые чередуются с четырьмя кластерами отрицательно заряженных AK остатков. Домены холодового шока у всех YB-белков практически идентичны. Кроме того, у YB-белков была отмечена высокая гомология (~90%) двух линкеров, фланкирующих CSD: N-концевого из 9 AK остатков (NC9) и C-концевого из 13 AK остатков (CC13) [5] (рис. 2).

По своим функциям белки описываемого семейства взаимозаменяемы, но только частично. Каждый из этих белков имеет свой профиль экспрессии в онтогенезе. YB-1 экспрессируется на протяжении почти всего онтогенеза и особенно активно на ранних стадиях развития. Белок постепенно исчезает с возрастом в разных органах в разное время. В старости у мыши YB-1 отсутствует во всех органах, кроме печени [43]. YB-2 присутствует в большом количестве в гаметах (ооцитах, яйцеклетках и сперматозоидах) и полностью исчезает у шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* на стадии гаструлы [44]. YB-3 представлен в зародыше млекопитающих, но после рождения



Рис. 2. Доменная организация ҮВ-белков.

NC9 – горизонтально закрашенная область; CC13 – вертикально закрашенная область. Плюсами и минусами обозначены кластеры положительно и отрицательно заряженных АК остатков.

его количество снижается во всех тканях, за исключением сердца, скелетных мышц, кровеносных сосудов и семенников [45, 46]. Недавно было показано, что YB-3 также обнаруживается в некоторых отделах мозга взрослых млекопитающих: избирательно в клетках глии, тогда как в нейронах присутствует YB-1 [47].

Нокаут гена YBX1 нарушает нормальное развитие мыши, начиная с 13,5 дня эмбрионального развития (E13,5). Животное обычно погибает перед рождением или сразу после него. Одновременный нокаут генов YBX1 и YBX3 приводит к гибели животного на 8,5–11,5 день эмбрионального развития (E8,5–11,5) [48, 49].

# ОБЩИЕ СВОЙСТВА УВ-1

Среди представителей YB-белков наиболее изученным является YB-1 человека. Прогресс в его изучении во многом связан с выяснением его роли в онкогенезе [50–52]. Первоначально YB-1 был найден как мажорный компонент мРНП частиц [53–55] и назван p50 в соответствии с его электрофоретической подвижностью. Позже был обнаружен и просеквенирован белковый продукт, взаимодействующий с промоторной областью генов главного комплекса гистосовместимости II (MHCII) [56] и с энхансорной областью гена рецептора эпидермального фактора роста [57], содержащих Y-бокс последовательность 5'–СТБАТТGG<sup>C</sup>/<sub>т</sub><sup>C</sup>/<sub>т</sub>AA–3'. В соответствии с этим фактом белок получил название Y-бокс связывающий белок 1 (YB-1). Определение первичной структуры белка p50 позволило отождествить его с YB-1 [58].

Несмотря на то, что электрофоретическая подвижность YB-1 соответствует белку массой 50 кДа, его молекулярная масса, рассчитанная по АК последовательности, равна 36 кДа. Таким образом, белок проявляет аномальную подвижность при электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия [42].

YB-1, выделенный из мРНП ретикулоцитов кролика, может образовывать мультимеры с коэффициентом седиментации около 18S и молекулярной массой до 800 кДа [58]. При атомносиловой и электронной микроскопии на подложке мультимерный белок выглядит как довольно однородное округлое образование диаметром около 30–40 нм и высотой около 8–10 нм [41]. Предполагается, что мультимеризация белка происходит за счет взаимодействия друг с другом С-доменов, при этом положительно заряженные кластеры на одной молекуле взаимодействуют с отрицательно заряженными кластерами на другой и наоборот [59]. Можно предположить, что CSD YB-1 за счет его димеризации [60] также участвует в образовании такого

мультимера. Гомодимер YB-1 образуется в результате взаимодействия Asp105 одной молекулы и Asp105' другой и стабилизируется сближением Phe66 и Phe66', а также водородной связью между Tyr99 и Glu107' [60].

При определенных условиях YB-1 и его фрагменты образуют обратимые амилоидные фибриллы. За образование фибрилл отвечает CSD, а N-концевой домен стимулирует этот процесс. Было отмечено, что первая половина CTD блокирует процесс фибриллообразования, тогда как его вторая половина снимает блокирующее действие первой, но только в растворе с высокой ионной силой [61].

### **УВ-1 В ЦИТОПЛАЗМЕ**

Большая часть YB-1 обнаруживается в цитоплазме в ассоциации с транслируемой и нетранслируемой мРНК. Однако ҮВ-1 был также найден в комплексе с микроРНК [62], фрагментами тРНК [63] и длинной некодирующей РНК [64]. Находясь в цитоплазме, YB-1 принимает участие в глобальной и специфической регуляции трансляции мРНК на стадии ее инициации. При этом YB-1 может как стимулировать процесс трансляции (при сравнительно низком соотношении ҮВ-1/мРНК), так и ингибировать трансляцию (при высоком соотношении YB-1/мРНК) [65]. YB-1 защищает мРНК от деградации, существенно повышая время ее жизни (до 100 раз) [66]. Свободный ҮВ-1 и ҮВ-1 в ненасыщенном комплексе с мРНК могут взаимодействовать с актином и микрофиламентами и локализовать трансляционно активную мРНК на актиновых микрофиламентах [67]. Связываясь с тубулином, он стимулирует образование микротрубочек, может участвовать в локализации на них трансляционно неактивной мРНК и в ее транспорте по микротрубочкам [68].

Взаимодействие YB-1 с микротрубочками митотического веретена может способствовать их сборке и стабилизации [69]. Избыточное связывание YB-1 с центросомами может нарушать их правильное удвоение в митозе, способствовать появлению дополнительных центросом, приводить к нарушению правильного расхождения хромосом и вызывать частичную анеуплоидию, что, в свою очередь, может приводить к раковой трансформации клеток [70]. Роль YB-1 в стресс-гранулах и транспортных гранулах менее изучена, в литературе представлены противоречивые данные. По одним источникам, YB-1 является обязательным компонентом стресс-гранул, он стимулирует их формирование, а его нокаут приводит к нарушению образования стресс-гранул в клетках [71]. Согласно другим источникам, YB-1 при повышенной концентрации препятствует сборке стресс-гранул [72].

### ҮВ-1 В ЯДРЕ

Переход ҮВ-1 из цитоплазмы в клеточное ядро происходит в цикле клеточного деления на границе G1 и S фаз и активирует экспрессию генов циклинов [73, 74]. Локализация белка в ядре также определяется воздействием некоторых ростовых факторов и цитокинов [42]. Процесс перехода также стимулируется ультрафиолетовым излучением и воздействием ксенобиотиков, вызывающих повреждение ДНК [42]. Недавно было показано, что переход YB-1 в ядро подчиняется циркадному ритму [75]. Ядерно-цитоплазматическое распределение YB-1 контролируется сигналом ядерной локализации (NLS) и сигналом цитоплазматического удержания (CRS) (рис. 3). Обычно CRS маскирует NLS, позволяя белку оставаться в цитоплазме. Специфическое отщепление CRS под действием 20S протеасомы приводит к переходу С-укороченной формы YB-1 (рис. 3) в клеточное ядро [76]. Другой механизм, стимулирующий переход полноразмерного YB-1 в клеточное ядро, связан с его фосфорилированием [77, 78]. В ядре ҮВ-1 может ко-локализоваться с РНК-полимеразой I, обнаруживаться в тельцах Кахаля [79]. Повышенная концентрация YB-1 может способствовать растворению ядрышек [80]. Находясь в ядре, ҮВ-1 может участвовать в репликации ДНК, в том числе вирусной, в ее репарации и в транскрипции большого количества генов, а также в альтернативном сплайсинге предшественников мРНК [42, 65]. Недавно было показано, что активность YB-1 может ингибироваться посредством взаимодействия с циркулярной РНК в ядре [81].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ҮВ-1 С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

Способность YB-1 связываться как с различными типами PHK, так и ДНК может свидетельствовать о низкой степени специфичности по отношению к типу нуклеиновых кислот. Тем не менее, YB-1 имеет большее сродство к PHK, чем к оцДНК, что может достигаться, как было продемонстрировано с помощью молекулярного моделирования, за счет образования дополнительных водородных связей, благодаря наличию 2'OH группы в рибозе. Кроме этого, методом молекулярной динамики было показано, что для YB-1 характерно ориентационнозависимое связывание с цепью нуклеиновой кислоты. Белок образует более прочные связи с PHK/ДНК в 5'→3' направлении [82].

YB-1 обладает приблизительно одинаковым сродством как к pPHK, так и к мPHK. Константа диссоциации (K<sub>D</sub>) комплекса YB-1 с PHK составляет около 4 нМ [83]. Взаимодействуя с PHK, YB-1 изменяет ее вторичную структуру. Его добавление к глобиновой мPHK при комнатной температуре вызывает плавление около 60% вторич-



Рис. 3. Известные АК остатки, которые подвергаются фосфорилированию и изменяют активность белка YB-1.

Стрелками обозначены АК остатки, по которым происходит укорочение YB-1: 1–180 – форма, использованная для ЯМР анализа; 219 – сайт, по которому белок укорачивается протеасомой 20S.

ной структуры. YB-1 может стимулировать отжиг комплементарных последовательностей ДНК и РНК, а также обмен комплементарных цепей нуклеиновых кислот до получения наиболее протяженных и совершенных дуплексов [58, 84].

YB-1 имеет значительно большее сродство к оцДНК, чем к дцДНК. Связывание с СТ-участком цепи ДНК приводит к появлению нуклеазочувствительных участков и образованию H-структуры на второй цепи ДНК. YB-1 способен связывать и разрушать двойные спирали ДНК с тупыми концами, дуплексы с выступающим 5'/3'-концом, а также ДНК с неспаренными основаниями и апуриновыми сайтами, либо обработанные цисплатином [84-86]. Экзонуклеазная (3'→5') активность белка [87] и повышенное сродство к поврежденным участкам [85] могут также подтверждать его участие в репарации ДНК в ядре.

Как уже отмечалось, при связывании YB-1 с нуклеиновой кислотой проявляется его двойственная природа: белок способен как стабилизировать, так и дестабилизировать вторичные структуры [88]. Взаимодействуя с дцДНК, YB-1 стимулирует ее плавление и мешает посадке других белковых факторов, отвечающих за транскрипцию [89]. Способность белка плавить вторичную структуру также подтверждена экспериментами на микрочипах, где в качестве субстрата использовали дцДНК. YB-1 связывается преимущественно с одной цепью в составе дуплекса и дестабилизирует его [90]. Предполагается, что за связывание дцДНК отвечает петля, соединяющая β3- и β4-тяжи CSD, поскольку ее замена на более короткую петлю прокариотического белка, также отличающуюся по аминокислотному составу, приводила к утрате этой способности [91].

### СТРУКТУРЫ, ФОРМИРУЕМЫЕ ҮВ-1 В КОМПЛЕКСЕ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

Эксперименты in vitro показали, что, в зависимости от соотношения YB-1/мРНК, могут образовываться различные структуры: некомпактные транслируемые мРНП и структуры «бусины на нити» [41]. В случае транслируемой мРНК (при сравнительно низком соотношении YB-1/мРНК) YB-1 присутствует на мРНК в виде мономеров, связываясь через CSD и CTD. При этом на одну молекулу YB-1 приходится ~ 80 нт мРНК. В случае нетранслируемой, насыщенной белком мРНК, YB-1 образует мультимеры – «бусины», состоящие из примерно 20 молекул, с молекулярной массой ~ 700 кД, диаметром 20 нм и высотой 7 нм, на каждую из которых приходится сегмент мРНК длиной 600-700 нт. Эти параметры позволяют предположить, что на одну молекулу YB-1 в этом мультимере приходится 30–35 нт мРНК [41]. Образование «бусины» на мРНК происходит, вероятно, по такому же принципу, как и образование мультимера свободного YB-1. Исследование вовлеченности доменов в этот процесс показало, что один CTD на РНК формирует структуры меньшего размера, чем полноразмерный белок, тогда как CSD совсем не способен образовывать «бусины» [92]. Это согласуется с ранее предложенной моделью организации насыщенных, нетранслируемых комплексов мРНК с YB-1, согласно которой «бусины» мультимерного YB-1 образуются при взаимодействии С-доменов YB-1 [41]. В пользу этой модели говорит тот факт, что в живых клетках методами микроскопии сверхвысокого разрешения и флуоресцентной корреляционной спектроскопии были обнаружены мРНК, связанные, в том числе, и с ҮВ-1 и формирующие структуры, подобные «бусинам на нити» [93].

Совсем недавно удалось закристаллизовать CSD YB-1 в комплексе со специфической последовательностью CAUC в составе гексамера 5'–UCAUCU–3', несмотря на сравнительно низкое сродство к олигонуклеотиду ( $K_D$ =1,26 µM). С помощью рентгеноструктурного анализа получена структура комплекса с разрешением 1,7Å [60]. На основе этих данных были определены AK остатки, участвующие в образовании  $\pi\pi$ -стэкинговых пар с азотистыми основаниями в последовательности CAUC:  $C_1$ ·His87,  $A_2$ ·Phe86,  $U_3$ ·Phe74 и  $C_4$ ·Trp65. Замена этих AK остатков приводила к полной потере способности YB-1 связываться с гексамером. В специфическом узнавании олигомера большую роль играют также водородные связи между  $C_1$  и Thr89,  $A_2$  и Lys118,  $U_3$  и Asp83 и Lys64. Замена одного из этих AK остатков приводила к незначительному снижению сродства белка к гексамеру (в 2–3 раза). Интересно, что в связывании CSD с сахарофосфатным

остовом принимает участие Asn70, который отсутствует в других CSD-содержащих белках (Lin28, CSP бактерий) [60].

Несколько раньше методом ЯМР были изучены комплексы YB-1(1–180), укороченного с С-конца (рис. 3), с поли(С), поли(Т) и поли(U) длиной 5, 10, 20 или 30 нт [94]. Анализ спектров ЯМР позволил определить консервативные АК остатки Trp65, Phe74 и Phe85, участвующие во взаимодействии с олигонуклеотидами. Использование YB-1(1–180), содержащего единственный кластер позитивно/ негативно заряженных АК СТD, позволило выявить дополнительные АК остатки за пределами CSD: Gly135, Ser136 и Lys137, вступающие во взаимодействия с фосфатами PHK [94]. Взаимодействие с этими остатками существенно повышает сродство YB-1(1–180) к PHK по сравнению с CSD.

Укороченная форма YB-1 (1–180) способна формировать с мРНК еще одну (третью) структуру – линейный нуклеопротеиновый филамент [94]. Используя данные малоуглового рентгеновского рассеяния и молекулярной динамики, удалось показать, что молекулы YB-1(1–180) располагаются вдоль цепи РНК/оцДНК в один слой, при этом на одну молекулу белка приходится 6 нт. Добавление последующих заряженных кластеров С-концевого домена приводит к формированию мультимерных белковых структур и изменяет упаковку мРНК в мРНП [94]. Связывание белковых партнеров или посттрансляционные модификации в СТD, который содержит много сайтов фосфорилирования [95], может также нейтрализовать сильный положительный заряд СТD и инициировать образование линейного нуклеопротеинового филамента в клетках. Несмотря на плотную упаковку YB-1(1–180) в комплексе с РНК, белок не ингибирует, а даже несколько стимулирует трансляцию мРНК [94].

Также проводились калориметрические исследования связывания димера YB-1 с РНК (5'–САUCCAACAAGA–3') и оцДНК (5'–ТТGGCCAATCAG–3'). Работа показала, что А/Р-домен не значим, а наиболее важным регионом для термодинамически выгодного связывания с РНК/оцДНК является область СТD со 130 по 219 АК остаток. При этом подтверждается большая роль CSD при димеризации и специфическом связывании с РНК [96].

YB-1 предпочитает связываться с суперскрученной ДНК в области пересечений спиралей, в том числе в присутствии конкурентной релаксированной цепи. На границе раздела двух скрещивающихся спиралей ДНК преимущественно локализуется СTD, при этом молекулы YB-1 могут взаимодействовать друг с другом. Таким образом, в местах повышенной конденсации ДНК формируются мультимеры.

Добавление белка к линеаризованной ДНК стимулирует формирование комплекса с характерной формой тороида [92].

### СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ YB-1 С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

Участие YB-1 в транскрипции генов, в том числе и вирусных, осуществляется по различным механизмам и было рассмотрено в ряде работ [42, 59]. Связываясь с ДНК, YB-1 регулирует активность многих генов, продукты которых участвуют в делении клеток, апоптозе, эмбриогенезе, иммунном ответе, развитии множественной лекарственной устойчивости, стрессовых ответах, опухолевом росте [42]. Такая множественная вовлеченность может говорить о том, что YB-1 взаимодействует с определенными последовательностями нуклеиновых кислот.

Связывание YB-1 с нуклеиновыми кислотами происходит преимущественно по одноцепочечным участкам. Эксперименты по конкуренции гомополирибонуклеотидов за связывание с YB-1 показали, что его сродство уменьшается в следующем порядке:

поли(G) > поли(U) > поли(A) > поли(C) [83].

При взаимодействии с оцДНК белок демонстрирует наибольшее предпочтение к G-богатым участкам. И чем длиннее G-содержащая последовательность, тем выше температура диссоциации ДНКбелкового комплекса [83, 90]. Нуклеотидные цепи, богатые гуанином, способны образовывать структуру, называемую G-квадруплексом. На данный момент в литературе представлены противоречивые данные относительно специфического узнавания квадруплексов белком YB-1 [97, 98].

В таблице показаны некоторые идентифицированные нуклеотидные последовательности, с которыми специфически связывается YB-1 и за счет которых может происходить селективная регуляция экспрессии генов.

Из таблицы видно, что белок преимущественно связывает G- и C-богатые области промоторов ДНК, что подтверждает результаты экспериментов *in vitro*. Такая же тенденция отмечается и для сайтов связывания на PHK. Было продемонстрировано, что при иммуно-преципитации YB-1 с PHK большинство сайтов связывания белка локализованы в 3'-нетранслируемых областях (3'-HTO) и экзонах, а в 5'-HTO и в интронных последовательностях их количество минимально [112]. Проанализировав известные сайты связывания, можно выделить последовательности, обогащенные CANC, CU и GC.

Связываясь с промоторными областями, ҮВ-1 ингибирует или

последовательно	ern, e koropbisin bsa	плоденствует т	
Тип нуклеиновой кислоты	Нуклеотидная последовательность	Метод идентификации	Ссылка
ДНК (промоторные об- ласти генов ДНК-полиме- разы α; матриксной метал- лопротеиназы-2; энхансер гена эритропоэтина)	5'-TGATTGG <sup>C</sup> / <sub>T</sub> <sup>C</sup> / <sub>T</sub> AA-3' (Ү-бокс)	гель-шифт анализ, ДНК футпринтинг	[99–101]
ДНК (промоторная область гена легкой цепи 2v миозина)	AGTGG	ДНК футпринтинг	[102]
ДНК (промоторные области на кодирующей и некодирующей нити ДНК GM-CSF)	ССТG и ACCA; ССТG и <sup>с</sup> / <sub>т</sub> СТG	УФ-сшивка	[103]
ДНК (GC-боксы в промоторах генов: SM22α, p21, Циклин Д1, ТβRI, KLF4, CCL5)	CCC <u>GC</u> C G <u>GC</u> GGGG CCCC <u>GC</u> CG CACCC <u>GC</u> C G <u>GC</u> GGGG CTGATGA <u>GC</u> TCAC	Олигонуклеотид- ный pull-down анализ	[104]
мРНК 3'-НТО (ҮВ-1 авторегуляция)	UCCA <sup>A</sup> / <sub>G</sub> CA	Футпринтинг. Гель-шифт анализ. Связывание на нитроцеллюлоз- ном фильтре	[105, 106]
мРНК 3'-НТО (Вирус Денге (+))	UCCAGGCA	гель-шифт анализ и ферментативный футпринтинг	[107]
мРНК (CD44 v5 экзон)	CA <sup>U</sup> / <sub>c</sub> C ( <u>CAUC</u> , <u>CACC</u> )	SELEX	[108]
микроРНК miR-29b2, miR-26a-2, miR-let-7g, miR-let-7a-2	U <sup>C</sup> / <sub>U</sub> AUC (U <u>CAUC</u> , UU <u>AUC</u> )	iCLIP	[62]
мРНК экзосомные и длин- ные некодирующие РНК	A <u>CCAG</u> CCU <u>CAGUG</u> AGC UA <u>AUC</u> CCA	Pull-down анализ	[109]
мРНК 5'-НТО (ферритин)	CAG <sup>U</sup> / <sub>C</sub> GC ( <u>CAGUG</u> C CAGCGC)		[110]
мРНК 5'-НТО (Snail1)	GC-обогащенные клас- теры		[111]
tiRNA CU-бокс		CLIP-seq	[112]
РНК	C <u>CUGC</u> GG GC <u>CUGC</u> G <u>CUGC</u> GGU GGU <u>CUGC</u> CCCUGCG	РНК pull-down анализ	[113]

Таблица.	Идентифи	ицированн	ые нуклеоти	дные
последовател	ьности, с	которыми	взаимодейст	вует ҮВ-1

активирует транскрипцию определенных генов [100-102, 104, 114]. Регуляция трансляции осуществляется посредством узнавания специфических сайтов в 5'-НТО [110, 111] или в 3'-НТО [106]. УВ-1 связывается с мРНК кооперативно [92]. Это может объяснять тот факт, что специфическое связывание YB-1 на 3'-НТО мРНК приводит к избирательному ингибированию трансляции этой мРНК на стадии ее инициации [105, 106]. Связываясь с 3'-НТО, ҮВ-1 участвует в регуляции локализации мРНК, что особенно важно для нейронов, где происходит локализованный синтез белка в аксонах [115]. Интересно, что белок может принимать участие в регуляции трансляции не только непосредственно связываясь с транслируемой мРНК, но и по другим механизмам. Например, ҮВ-1 взаимодействует с 5'-фрагментами тRNA<sup>Ala</sup> и тРНК<sup>Суз</sup>, индуцируемыми ангиогенином, и вытесняет eIF4F с кэп структуры мРНК, ингибируя трансляцию [63]. Также YB-1 связывается с микроРНК и регулирует ее процессинг на посттранскрипционном уровне [62], а также участвует в ее сортировке в экзосомы [116].

### СПЕЦИФИЧЕСКОЕ УЗНАВАНИЕ БЕЛКОМ YB-1 МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Помимо вышеописанных последовательностей, YB-1 способен узнавать модифицированные нуклеотиды в мРНК. Первым было изучено взаимодействие белка с кэпом, в состав которого входит метилированный по 7 положению гуанин (m<sup>7</sup>G). Связываясь с ним своим CSD, YB-1 регулирует стабильность и активность мРНК в трансляции [117, 118].

Другим модифицированным остатком в мРНК, узнаваемым YB-1, является 8-оксогуанин, который образуется при окислительном стрессе. Взаимодействие YB-1 с такой мРНК выводит её из трансляции и, таким образом, препятствует появлению ошибок в ходе биосинтеза белка [119].

Совсем недавно YB-1 был охарактеризован как белок, прочитывающий последовательность мPHK с 5-метилцитозином (m<sup>5</sup>C). Методом изотермической титрационной калориметрии было показано, что CSD имеет большее сродство к PHK-олигонуклеотиду 5'-UCAU(m<sup>5</sup>C)U-3', чем к неметилированному олигонуклеотиду 5'-UCAUCU-3'. Помимо этого, рентгеноструктурный анализ комплекса YB-1 с PHK позволил определить Trp65 как основной остаток, ответственный за узнавание m<sup>5</sup>C [120]. Есть данные о том, что YB-1 участвует в стабилизации материнской m<sup>5</sup>C-мPHK на ранних стадиях развития эмбрионов *Danio rerio* [121]. Но до конца роль связывания YB-1 с m<sup>5</sup>C остается неясной.

### РОЛЬ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ YB-1 В СВЯЗЫВАНИИ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

Роль ковалентных модификаций YB-1 в связывании нуклеиновых кислот пока мало изучена. Эксперименты в основном проводились на очищенных рекомбинантных белках. В клетке белок подвергается посттрансляционным модификациям, регулирующим его биологическую активность (см. рис. 3).

Под действием разных стимулов активируются соответствующие киназы и запускается фосфорилирование YB-1, что может приводить к его перемещению в ядро. Локализация фосфорилированного AK остатка, по-видимому, имеет большое значение для узнавания различных сайтов в ДНК за счет повышения сродства к ним. Такое специфическое связывание может вызывать активацию или репрессию транскрипции различных групп генов [95, 122–125]. Известно, что YB-1 репрессирует транскрипцию VEGF, связываясь с одноцепочечной областью промотора, определяющей чувствительность к гипоксии (HRR). При этом *in vitro* фосфорилирование киназами GSK3β и ERK2 сайтов YB-1, расположенных в A/P домене (Ser21 и Ser36), усиливает его связывание с этой областью. Таким образом, с помощью модификации указанных AK остатков можно повысить ингибирующий эффект YB-1 на транскрипцию *VEGF* мPHK в клетках [122].

Фосфорилирование YB-1 по Ser165, запускаемое IL-1β, вызывает рост опухоли через активацию сигнального пути NF-кВ [95]. Недавно было показано, что модификация YB-1 по Ser176 при обработке IL-1β также приводит к активации этого пути. При этом, в зависимости от того, по какому из двух остатков (Ser165 или Ser176) фосфорилируется YB-1, регулируется экспрессия разных групп генов, находящихся под контролем NF-кВ [125]. Помимо этого, фосфорилирование YB-1 по сайту Ser165 приводит к переходу YB-1 в ядро [95]. Можно предположить, что различно модифицированный YB-1 (по Ser165 или Ser176) не просто активирует NF-кВ, а совместно с ним распознает мотивы ДНК и регулирует транскрипцию соответствующей группы генов.

Фосфорилирование YB-1 по Ser102 приводит к активации трансляции по кэп-зависимому механизму. Модифицированный по этому АК остатку YB-1 теряет сродство к кэпу, что способствует быстрой сборке комплекса eIF4F на мРНК и облегчению процесса инициации трансляции [123]. При определенных условиях фосфорилирование YB-1 по Ser102 приводит к его переходу в ядро. Отмечено, что нахождение белка в ядре стимулирует клеточный рост [77]. Таким образом, можно сделать предположение, что модификация YB-1 по Ser102 влияет на экспрессию генов как на уровне транскрипции, так и трансляции.

Фосфорилирование YB-1 по Туг99 приводит к транслокации YB-1 в ядро и репрессии промотора гена Collal, что оказывает положительный эффект при почечном фиброзе [124]. Интересно, что именно этот АК остаток участвует в димеризации YB-1 [60]; таким образом, его фосфорилирование также может влиять на олигомеризацию белка.

Интересный механизм регуляции транскрипции гена CCL5 модифицированным YB-1 описан при дифференцировке моноцитов в макрофаги. На ранней стадии этого процесса фосфорилированный по Ser102 YB-1 связывается с промотором и активирует экспрессию гена CCL5. На более поздней стадии серин-треонин-зависимая фосфатаза кальциневрин дефосфорилирует белок. Таким образом, снижается сродство YB-1 к промотору и прекращается синтез CCL5 [126].

Другие модификации также могут оказывать влияние на транскрипционную активность YB-1, как это было обнаружено для YB-1, O-гликозилированного по Thr126 [127]. Помимо этого, модификации YB-1 могут влиять на репарацию ДНК. Белок может взаимодействовать с полимеразой PARP1 как в комплексе с поврежденной ДНК, так и в свободном состоянии. При достижении определенного соотношения белков в комплексе (YB-1/PARP1 < 10/1) происходит автомодификация PARP1 и поли(АДФ-рибозил)ирование YB-1. При этом снижается сродство YB-1 к ДНК, что позволяет другим белкам восстановить поврежденный участок [128, 129].

Благодаря своей многофункциональности, YB-1 может оказывать влияние на течение целого ряда заболеваний. Его рассматривают как предиктор ряда онкологических заболеваний, а также как потенциальную мишень для новых антираковых лекарственных препаратов [50, 52] и даже как потенциальный лекарственный препарат при болезни Альцгеймера [130].

# **V. LIN28**

Другим хорошо изученным РНК-связывающим белком с CSD является Lin28. Этот белок, обнаруженный в различных беспозвоночных и позвоночных, характеризуется структурой, уникальной для белков с CSD. В N-концевой части Lin28 находится CSD, в C-концевой части – 2 мотива «цинковый палец» ССНС-типа. В некоторых вариантах этого белка также присутствуют дополнительные последовательности длиной несколько десятков аминокислотных остатков, располагающиеся перед CSD и после «цинковых пальцев» [131]. У человека имеются две изоформы Lin28A (209 AK остатков) и Lin28B (250 AK остатков) (рис. 4).



Рис. 4. Доменная организация двух изоформ белка Lin-28.

Идентичность CSD у двух белков равняется 85.5%. Основываясь на данных статьи [132] долгое время принималось, что Lin28A локализован в цитоплазме, а Lin28B в ядре. Однако в нескольких более поздних публикациях было показано, что большая часть Lin28B присутствует в цитоплазме [133, 134].

Изучение функционирования Lin28 в различных тканях и органах организмов, находящихся в разных фазах развития, позволило охарактеризовать его как активатор клеточного деления и ингибитор дифференцировки [131]. Низкая экспрессия Lin28A и Lin28B приводит к уменьшению скорости роста и развития организмов [135]. Lin28 принимает самое непосредственное участие в перепрограммировании соматических клеток в стволовые [136, 137]. Повышенная экспрессия Lin28 наблюдается в наименее дифференцированных и наиболее агрессивных раковых опухолях [138, 139]. Lin28 функционирует как онкобелок и стимулирует развитие опухолей и метастазирование при различных раковых заболеваниях человека [140]. Помимо указанных выше процессов Lin28 принимает участие в регуляции метаболизма и, в частности, гликолиза и связанных с ним процессов [141, 142].

Исходно Lin28 вместе с семейством микроРНК let-7 были открыты в нематоде *Caenorhabditis elegans* как гетерохронные гены, регулирующие время развития [143, 144]. Недавно были получены данные, свидетельствующие в пользу участия Lin28B/let-7 в регуляции длительности развития почек у мышей [145]. У млекопитающих семейство let-7 представлено 12 членами, мишенями которых являются онкогены и многочисленные гены, участвующие в поддержании плюрипотентности [146]. Интерес к Lin28/let-7 существенно вырос после обнаружения, что Lin28 относится к 4 факторам, необходимым для перепрограммирования дифференцированных клеток человека в индуцибильные плюрипотентные стволовые клетки [136].

Многочисленные работы показали, что Lin28 блокирует созревание let-7 [131]. Ингибирование образования зрелой let-7 может происходить тремя путями. По одному Lin28 нарушает в ядре процессинг pri-let-7 нуклеазой Drosha [147, 148]. По другому, Lin28 блокирует

процессинг pre-let-7 нуклеазой Dicer [149]. И, наконец, по третьему пути, Lin28 способствует полиуридилированию pre-let-7 с 3'-конца путем образования комплекса Lin28/pre-let-7 с терминальной уридилтрансферазой TUT4 [150, 151]. Далее 3'–5' экзонуклеаза Dis3I2 деградирует уридилированный pre-let-7 [152]. Имеются основания полагать, что в образовании тройного комплекса Lin28/pre-let-7/TUT4 основную роль играет С-концевой домен Lin28 с 2 ZnF (ZKD) [133]. Интересно, что для полиуридилирования необходимо в тройном комплексе ZKD/pre-let-7/TUT4 наличие в pre-let-7 двуцепочечного участка длиной не менее 15 нуклеотидных пар.

Во взаимодействии с pre-let-7 принимают участие оба домена – CSD и ZKD [153 154]. Рентгеноструктурный анализ кристаллографических комплексов Lin28 с предшественниками pre-let-7d, pre-let-7-f1 и pre-let-7g показал, что Lin28 связывается с pre-let-7 с двумя разными одноцепочечными мотивами, расположенными в терминальной петле, соединенной со «стеблем» в let-7 [153]. ZKD связывается с мотивом GGAG, тогда как CSD - с мотивом GNGAY, где Y - пиримидин, а N – любое основание. С помощью ЯМР-спектроскопии в этой же работе показано, что линкер, соединяющий между собой оба домена, CSD и ZKD, представляет собой гибкую структуру, что позволяет, видимо, Lin28 взаимодействовать со всеми членами семейства let-7, за исключением только одного let-7a-3 (ортолог у мыши let-7c-2), который не содержит в своем составе GGAG [155]. Исследование сродства Lin28, CSD и ZKD к разным членам семейства pre-let-7 показало, что наибольшее сродство к pre-let-7 проявляет полный белок Lin28, среднее сродство – CSD и наименьшее сродство – ZKD [133, 153, 154]. Основываясь на полученных данных предполагается, что связывание Lin28 с pre-let-7 происходит в два этапа [154]. На первом с pre-let-7 связывается CSD. Это связывание CSD в свою очередь приводит к изменению конформации pre-let-7, в результате которой его мотив GGAG становится доступным для связывания с ZKD. Связывание ZKD с этим мотивом фиксирует комплекс Lin28/pre-let-7 в конформации, нарушающей взаимодействие Dicer с pre-let-7.

Уточнение мотива в pre-let-7 для связывания с CSD было получено с использованием программного обеспечения [156–158], специально созданного для анализа баз данных, полученных методами HITS-Clip и Clip-sec. Эти методы включают в себя кросс-сшивание Lin28 с PHK, иммунопреципитацию с последующим широкомасштабным секвенированием. Разработанные компьютерные методы были приложены к базам данных, полученных при анализе иммунопреципитата Lin28/PHK из лизата эмбриональных стволовых

клеток [159] и из клеточных линий К652 и НерG2 [160]. В результате этого анализа был обнаружен мотив (U)GAU [161], находящийся в области предсказанного ранее мотива GNGAY [153].

Из 12 членов семейства let-7 только 6 pre-let-7: pre-let-7b, pre-let-7d, pre-let-7f-1, pre-let-7g и mir-98 имеют оба мотива (U)GAU и GGAG, pre-let-7i имел GAU мотив (семейство CSD+). Остальные, за исключением let-7a-3, имеют только один мотив GGAG для связывания с ZKD (семейство CSD<sup>-</sup>). В этой же работе [161] приведены данные, показывающие, что Lin28 проявляет более высокую аффинность по отношению к pre-let-7 семейства CSD<sup>+</sup> и что члены этого семейства *in vivo* в гораздо большей степени подвержены полиуридилированию и последующей деградации.

Кроме регуляции процессинга pri- и pre-let-7 Lin28 также контролирует количество специфичной для мозга miRNA-9 с помощью механизма, независимого от полиуридилирования [162]. Интересно, что в отличие от pre-let-7, взаимодействие Lin28 с pre-miRNA-9 не зависит от наличия в ней мотива GGAG [163]. При этом конститутивная экспрессия Lin28A в течение дифференцировки нейронов *in vitro* как положительно, так и отрицательно влияет на количество различных микроPHK. Этот эффект сверхэкспрессии Lin28 на микроPHK благодаря падению уровня let-7 может быть обусловлен перераспределением в семействах микроPHK, ассоциациированных с белком Argonaute [164]. Такое перераспределение в свою очередь может привести к обширным изменениям в трансляции.

Имеются также и другие многочисленные данные, указывающие на существование в клетках млекопитающих путей, отличных от Lin28/let-7, по которым Lin28 оказывает свое влияние на самые разнообразные внутриклеточные процессы. Прежде всего, это способность Lin28 взаимодействовать с большим набором мРНК, порядка нескольких тысяч, показанная как с использованием кросссшивания, иммунопреципитации и последующего широкомасштабного секвенирования [159, 165–167], так и исследования РНК непосредственно в иммунопреципитате [168]. Анализ сайтов в иммунопреципитате РНК с заменой Т на С в месте кросс-сшивания Lin28 с РНК и сайтов в месте остановки реакции обратной транскрипции показал, что Lin28 связывается большей частью с кодирующей областью мРНК или с некодирующей З'-НТО. В результате анализа сайтов связывания Lin28/RNA было предположено два мотива AAGNNG и AAGNG для узнавания Lin28, располагающихся обычно в терминальной петле шпилечной структуры РНК [159]. Анализ РНКмишеней для Lin28 указывает также на вероятную авторегуляцию Lin28 и на участие Lin28 в регуляции сплайсинга [165]. Среди

It. C. Dyonania a couoni.	К.	С.,	Бvð	жина	и	соавт.
---------------------------	----	-----	-----	------	---	--------

наиболее часто определяемых РНК-мишеней для Lin28 в клетках НЕК293 оказывается собственная мРНК и мРНК, кодирующие другие РНК-связывающие белки и регуляторы клеточного цикла [167].

Исследования эмбриональных стволовых и раковых клеток с использованием сверхэкспрессии или РНК-интерференции также указывают на существование путей регуляции клеточных процессов с участием Lin28, отличных от let-7 [131, 140, 169]. Однако, конкретные механизмы таких путей регуляции пока остаются неизвестными.

При широкомасштабном исследовании протеома и фосфопротеома эмбриональных стволовых клеток человека при диффенцировке [170, 171] в Lin28 были идентифицированы 4 фосфорилированных AK остатка: Ser3/Ser5, Ser120, Ser180 и Ser200, один из которых, а именно Ser200 находился в мотиве, узнающем МАРК [172]. С использованием различных ингибиторов МАРК было обнаружено, что Ser200 в Lin28 фосфорилируется МАРК/ЕRК. При этом оказалось, что фосфорилирование Ser200 повышает стабильность Lin28, не влияет на количество let-7 в клетках, но, тем не менее, повышает эффективность Lin28 при перепрограммировании дифференцированных клеток в плюрипотентные.

До недавнего времени Lin28 рассматривали исключительно как PHK-связывающий белок. Однако, сравнительно недавно было показано [173], что Lin28 в эмбриональных стволовых клетках мыши осуществляет регуляцию транскрипции путем эпигенетической модификации ДНК. На начальном этапе Lin28 связывается с определенными сайтами в ДНК (CAGnACC"–nn–"GGACAG) в области промотора в непосредственной близости от сайта инициации транскрипции. Это, в свою очередь, способствует присоединению к данному месту генома 5-метилцитозин-диоксигеназы (Tet1), преобразующей 5-метилцитозин в 5-гидроксиметилцитозин. Нокдаун Lin28 или Tet1 приводит к нарушению в регулировании метилирования ДНК и к изменению экспрессии генов. Этот результат заставляет совершенно по-новому смотреть на возможные пути участия Lin28 в регуляции разнообразных процессов в клетках млекопитающих.

# VI. БЕЛКИ С ДОМЕНОМ ХОЛОДОВОГО ШОКА РАСТЕНИЙ

Гены, кодирующие белки с CSD, были обнаружены в растениях различных систематических групп, относящихся к низшим растениям, однодольным, двудольным и древесным формам [174]. При этом, для всех видов растений, геномы которых исследовались на предмет наличия соответствующих генов, показано присутствие по крайней

мере двух представителей этого семейства. Именно такое количество генов, кодирующих белки с CSD, содержат рис *Oryza sativa*, кукуруза *Zea mays*, сорго *Sorghum bicolor* и виноград *Vitis vinifera*; самое большое количество генов обнаружено в геноме сои *Glycine max* – семь [175].

Все белки с CSD растений имеют сходное строение [175]. Их доменная структура наиболее близка к структуре Lin28: в N-концевой части этих белков находится CSD, в С-концевой части – обычно от 2 до 7 мотивов «цинковый палец» ССНС-типа [175]. Белки с CSD из низших растений могут содержать несколько CSD [176], однако для высших растений это нехарактерно. В отличие от Lin28, растительные белки с CSD имеют повышенное содержание глицина и аргинина в С-концевой части. «Цинковые пальцы» типа ССНС состоят из 14 АК остатков CNNCNNNHNNNNC (серым закрашены АК, координирующие ион цинка). Аминокислотные последовательности различных ZnF неодинаковы, наиболее вариабельные остатки -2, 3, 35 и 6-й. Они отличаются между собой как в рамках одного белка, так и между разными белками с CSD. Пока остается непонятным, с чем может быть связано разнообразие первичных структур ZnF. В работе [177] было высказано предположение, что у растений вероятное разнообразие белков-партнеров для каждого из белков с CSD может зависеть от количества ZnF и от их первичной структуры.

Трехмерные структуры для белков с CSD из растений к настоящему времени не установлены.

Степень изученности функций белков с CSD растений значительно уступает таковой для белков с CSD животных. Экспрессия белков с CSD растений возрастает при понижении температуры окружающей среды [174, 176, 178–181]. Закаливание озимого сорта мягкой пшеницы вызывало существенное накопление белков с CSD в тканях конуса нарастания, сохранностью которого определяется общая морозоустойчивость растения, в то время как в яровом сорте подобного эффекта не наблюдалось [182]. В древесном модельном растении кизиле блестящем *Cornus sericea* с помощью вестерн-блоттинга было показано, что в периоды максимальной холодоустойчивости этого растения наблюдается наибольшее накопление белков с CSD [176].

При оптимальной температуре экспрессия генов, кодирующих различные белки с CSD растений, наблюдается главным образом в молодых растениях, а также в меристематических и генеративных тканях, что было показано для *Arabidopsis thaliana*, пшеницы и риса [178–180, 182–184].

Исследование растений *A. thaliana*, в которых экспрессия генов, кодирующих белки с CSD, была искусственно снижена или повышена, подтверждает участие этих белков в холодоустойчивости

и развитии. Линии *A. thaliana* с нокаутом по гену AtCSDP3 были более чувствительны к отрицательным температурам, чем растения дикого типа, причем как после акклиматизации, так и в ее отсутствие. Сверхэкспрессия AtCSDP3 вызывала повышение морозоустойчивости растений [180]. Сверхэкспрессия белка AtCSDP4 приводила к возникновению ряда отклонений в развитии растений *A. thaliana*, таких как уменьшение длины стручка, понижение жизнеспособности семязачатков, а также сморщивание и побурение семян, начиная с ранней стадии «сердечка» [185]. Мутантные линии, в которых экспрессия белка AtCSDP2 была повышена или снижена, демонстрировали различные отклонения в апикальном доминировании, времени цветения или развитии генеративной сферы [178].

Молекулярный механизм, посредством которого белки с CSD принимают участие в стрессоустойчивости и развитии растений, в настоящий момент не установлен. По аналогии с белками с CSD животных и бактерий, для белков растений предполагаются функции, опосредованные взаимодействием с нуклеиновыми кислотами. Для различных белков с CSD растений продемонстрирована ядерноцитоплазматическая локализация, которая свидетельствует в пользу участия этих белков в процессах, связанных с образованием и функционированием мРНК [178, 180, 186–188]. Взаимодействие белков с CSD растений с ДНК и РНК продемонстрировано *in vitro* с использованием синтезированных олигонуклеотидов. При этом, белки с CSD растений способны, подобно гомологичным белкам животных и бактерий, проявлять плавящую активность в отношении вторичных структур в нуклеиновых кислотах [186, 188].

Наиболее подробно взаимодействие белков с CSD растений с нуклеиновыми кислотами *in vitro* исследовано на примере белков EsCSDP1, EsCSDP2, EsCSDP3 из растения *Eutrema salsugineum* [177, 189, 190]. Для этих белков показана способность плавить вторичные структуры в молекулах ДНК и РНК с различной последовательностью нуклеотидов и пространственной структурой. При этом с использованием ДНК-олигонуклеотидов было показано, что для плавления вторичной структуры требуется связывание белка одноцепочечным участком, прилегающим ко вторичной структуре с 3'-направления; для эффективного плавления размер одноцепочечного участка должен составлять не менее 7–8 нуклеотидов. ДНК- и РНК-плавящая активность была выше у белков, содержащих большее количество мотивов «цинковый палец» в С-концевой части [191].

Белки с CSD проявляют большее сродство к оцРНК, однако, в отличие от ДНК, для связывания с РНК наличие одноцепочечного участка не является необходимым [177]. Как и в случае с ДНК

основную роль при неспецифическом связывании с РНК играет С-концевой домен с ZnF, при этом с увеличением количества ZnF в С-концевом домене сродство к РНК возрастает. Если в случае специфического связывания Lin28 или его доменов с pre-let-7 аффинность подчиняется закономерности Lin28 > CSD > ZKD, то, например, при неспецифическом связывании EsCSDP1 с PHK как и с ДНК порядок распределения аффинности иной, а именно EsCSDP1 > ZKD > CSD [177, 189]. Кроме этого, для связывания EsCSDP с PHK *in vitro* оказалось необходимым присутствие G в месте связывания как в оцPHK, так и в дцPHK.

В иммунопреципитате белка AtCSDP1 из A. thaliana [192], как и в случае с Lin28 [159, 165–168], было обнаружено несколько тысяч различных мРНК, что также указывает на довольно неспецифичное взаимодействие in vivo этого белка с РНК. Эти мРНК в большинстве своем кодировали белковые продукты, вовлеченные в энергоемкие клеточные процессы, такие как биогенез рибосом. Нуклеотидный состав их 5'-НТО характеризовался повышенным содержанием GC-пар, что потенциально затрудняет трансляцию этих мРНК в неблагоприятных для растительного организма условиях [193, 194]. Было установлено, что 5'-НТО этих мРНК склонны к образованию вторичных структур, вследствие чего для их эффективной трансляции требуется взаимодействие с белком, обладающим РНК-плавящей активностью. Предполагается, что AtCSDP1, по аналогии с CSP прокариот, проявляет РНК-плавящую активность в отношении определенных мРНК, облегчая взаимодействие с ними 43S-преинициаторного комплекса и, в конечном счете, способствуя их трансляции [192]. Интересно при этом, что AtCSDP1 обнаруживался во фракции полисом, что свидетельствует о его участии в трансляции; снижение температуры вызывало обогащение фракции полисом этим белком.

Помимо неспецифического взаимодействия белков с CSD растений с PHK, нельзя исключать специфическое взаимодействие этих белков с определенными молекулами-мишенями PHK в растительной клетке. Об этом свидетельствуют, в частности, недавно полученные данные о способности белка с CSD PpCSP1 мха *Physcomitrella patens* регулировать перепрограммирование дифференцированных клеток листа в апикальные стволовые клетки хлоронемы [195]. Следует заметить, что близкий PpCSP1 по аминокислотной последовательности и доменной структуре Lin28 участвует в репрограммировании фибробластов человека в плюрипотентные стволовые клетки iPS [136].

# **VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Характерной особенностью белков с CSD является их повышенная экспрессия в активно делящихся клетках. Прокариотические CSP необходимы клеткам для роста в неблагоприятных условиях и на стадии активного деления. Белки с CSD эукариот, помимо регуляции роста клеток, участвуют в их дифференцировке и дедифференцировке. Для эукариот эти процессы в онтогенезе имеют сложную временную зависимость и контролируются многочисленными клеточными регуляторами.

Участие белков с CSD в регуляции экспрессии генов на разных уровнях происходит за счет их ДНК/РНК-связывающей способности. При этом специфичность и сила таких взаимодействий изменяется с усложнением организации белков. Прокариотические белки, обладающие только CSD, регулируют экспрессию генов за счет их РНК-плавящей активности. Наличие дополнительных доменов у белков эукариот обеспечивает более сложные взаимодействия с нуклеиновыми кислотами. Так, в определенных условиях их ДНК/ РНК плавящая активность может сменяться отжигающей. Такая двойственность позволяет белкам с CSD стимулировать образование более совершенных дуплексов, а также облегчает переход молекул РНК из энергетически невыгодных конформаций в более выгодные. Дополнительный контроль функциональности белков с CSD обеспечивается различными посттрансляционными модификациями, происходящими под влиянием стрессовых факторов или клеточных эффекторов. Как следствие, эти белки часто бывают задействованы в различных патологических процессах организма, в частности в опухолеобразовании.

Исследования по поиску специфических нуклеотидных последовательностей и идентифицикация АК остатков, участвующих во взаимодействиях с ними, необходимы для понимания механизмов работы белков с CSD. За последний год было получено несколько структур белка YB-1 с разными олигонуклеотидами, что позволило экспериментально показать АК остатки, участвующие в образовании связей с нуклеиновыми кислотами. Выявление важных для функционирования АК остатков позволит разработать новые подходы при лечении раковых и нейродегенеративных заболеваний.

# Благодарности

Авторы выражают искреннюю благодарность Е.В. Серебровой за помощь в подготовке публикации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

# ЛИТЕРАТУРА

- 1. Hudson, W.H., Ortlund, E.A. (2014) The structure, function and evolution of proteins that bind DNA and RNA, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **15**, 749–760.
- Horn, G., Hofweber, R., Kremer, W., Kalbitzer, H.R. (2007) Structure and function of bacterial cold shock proteins, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1457–1470.
- 3. Maris, C., Dominguez, C., Allain, F.H.T. (2005) The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression, *FEBS Journal*, **272**, 2118– 2131.
- Schröder, K., Graumann, P., Schnuchel, A., Holak, T. A., Marahiel, M. A. (1995) Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of singlestranded DNA containing the Y-box motif, *Molecular Microbiology*, 16, 699–708.
- Kleene, K.C. (2018). Y-box proteins combine versatile cold shock domains and arginine-rich motifs (ARMs) for pleiotropic functions in RNA biology, *Biochemical Journal*, 475, 2769–2784.
- Kremer, W., Schuler, B., Harrieder, S., Geyer, M., Gronwald, W., Welker, C., Jaenicke R., Kalbitzer, H.R. (2001) Solution NMR structure of the cold-shock protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, *European Journal of Biochemistry*, 268, 2527–2539.
- Schnuchel, A., Wiltscheck, R., Czisch, M., Herrler, M., Willimsky, G., Graumann, P., Marahiel, M.A., Holak, T.A. (1993) Structure in solution of the major cold-shock protein from *Bacillus subtilis*, *Nature*, **364**, 169–171.
- Jones, P.G., VanBogelen, R.A., Neidhardt, F.C. (1987) Induction of proteins in response to low temperature in

*Escherichia coli, Journal of Bacteriology*, **169**, 2092–2095.

- 9. Etchegaray, J.P., Jones, P.G., Inouye, M. (1996) Differential thermoregulation of two highly homologous cold-shock genes, CspA and CspB, of *Escherichia coli*, *Genes to Cells*, **1**, 171–178.
- Etchegaray, J.P., Inouye, M. (1999) CspA, CspB, and CspG, major cold shock proteins of *Escherichia coli*, are induced at low temperature under conditions that completely block protein synthesis, *Journal of Bacteriology*, **181**, 1827–1830.
- Gualerzi, C.O., Giuliodori, A.M., Pon, C.L. (2003) Transcriptional and post-transcriptional control of coldshock genes, *Journal of Molecular Biology*, 331, 527–539.
- Zhang, Y., Burkhardt, D.H., Rouskin, S., Li, G.W., Weissman, J.S., Gross, C.A. (2018) A stress response that monitors and regulates mRNA structure is central to cold shock adaptation, *Molecular Cell*, **70**, 274–286.
- Goldstein, J., Pollitt, N.S., Inouye, M. (1990) Major cold shock protein of Escherichia coli, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 87, 283–287.
- 14. Schindelin, H., Jiang, W., Inouye, M., Heinemann, U. (1994) Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **91**, 5119–5123.
- 15.Graumann, P.L., Marahiel, M.A. (1998) A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain, *Trends in Biochemical Sciences*, 23, 286–290.
- Phadtare, S., Alsina, J., Inouye, M. (1999) Cold-shock response and coldshock proteins, *Current Opinion in Microbiology*, 2, 175–180.

- Wang, N., Yamanaka, K., Inouye, M. (1999) CspI, the Ninth Member of the CspA Family of *Escherichia coli*, Is Induced upon Cold Shock, *Journal of Bacteriology*, **181**, 1603–1609.
- Bae, W., Phadtare, S., Severinov, K., Inouye, M. (1999) Characterization of *Escherichia coli* cspE, whose product negatively regulates transcription of CspA, the gene for the major cold shock protein, *Molecular Microbiology*, **31**, 1429–1441.
- 19. Yamanaka, K., Mitani, T., Ogura, T., Niki, H., Hiraga, S. (1994) Cloning, sequencing, and characterization of multicopy suppressors of a mukB mutation in *Escherichia coli*, *Molecular Microbiology*, **13**, 301–312.
- 20. Xia, B., Ke, H., Inouye, M. (2001) Acquirement of cold sensitivity by quadruple deletion of the cspA family and its suppression by PNPase S1 domain in *Escherichia coli*, *Molecular Microbiology*, **40**, 179–188.
- Mueller, U., Perl, D., Schmid, F.X., Heinemann, U. (2000) Thermal stability and atomic-resolution crystal structure of the *Bacillus caldolyticus* cold shock protein, *Journal of Molecular Biology*, **297**, 975–988.
- 22. Schindelin, H., Marahiel, M.A., Heinemann, U. (1993) Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein, *Nature*, **364**, 164–168.
- 23. Newkirk, K., Feng, W., Jiang, W., Tejero, R., Emerson, S.D., Inouye, M., Montelione, G.T. (1994) Solution NMR structure of the major cold shock protein (CspA) from *Escherichia coli*: identification of a binding epitope for DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **91**, 5114–5118.
- 24. Jiang, W., Hou, Y., Inouye, M. (1997) CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone, *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 196–202.

- Phadtare, S., Inouye, M. (1999) Sequence-selective interactions with RNA by CspB, CspC and CspE, members of the CspA family of *Escherichia coli*, *Molecular Microbiology*, 33, 1004–1014.
- 26. Lopez, M.M., Yutani, K., Makhatadze, G.I. (2001) Interactions of the cold shock protein CspB from *Bacillus* subtilis with single-stranded DNA. Importance of the T base content and position within the template, *Journal of Biological Chemistry*, 276, 15511–15518.
- Phadtare, S., Inouye, M., Severinov, K. (2002) The nucleic acid melting activity of *Escherichia coli* CspE is critical for transcription antitermination and cold acclimation of cells, *Journal of Biological Chemistry*, 277, 7239–7245.
- 28. Rennella, E., Sára, T., Juen, M., Wunderlich, C., Imbert, L., Solyom, Z., Favier, A., Ayala, I., Weinhaupl, K., Shanda, P., Konrat, R., Kreutz., K., Brutscher, B. (2017) RNA binding and chaperone activity of the *E. coli* cold-shock protein CspA, *Nucleic Acids Research*, **45**, 4255–4268.
- 29. Bae, W., Xia, B., Inouye, M., Severinov, K. (2000) *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **97**, 7784–7789.
- Ermolenko, D.N., Makhatadze, G.I. (2002) Bacterial cold-shock proteins, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 1902–1913.
- Barria, C., Malecki, M., Arraiano, C.M. (2013) Bacterial adaptation to cold, *Microbiology*, 159, 2437–2443.
- Rudan, M., Schneider, D., Warnecke, T., Krisko, A. (2015) RNA chaperones buffer deleterious mutations in *E. coli. Elife*, 4, 1–16.
- Yamanaka, K. (1999) Cold shock response in *Escherichia coli*, *Journal* of Molecular Microbiology and Biotechnology, 1, 193–202.

- 34. Phadtare, S., Inouye, M. (2001) Role of CspC and CspE in regulation of expression of RpoS and UspA, the stress response proteins in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, **183**, 1205–1214.
- 35. Feng, Y., Huang, H., Liao, J., Cohen, S.N. (2001) *Escherichia coli* poly (A)-binding proteins that interact with components of degradosomes or impede RNA decay mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase E, *Journal of Biological Chemistry*, 276, 31651–31656.
- 36. Chang, B.E., Lin, C.Y., Kuo, C.M. (1999) Molecular cloning of a coldshock domain protein, zfY1, in zebrafish embryo, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1433, 343–349.
- 37. Falsone, F.S., Weichel, M., Crameri, R., Breitenbach, M., Kungl, A.J. (2002) Unfolding and double-stranded DNA binding of the cold shock protein homologue Clah8 from *Cladosporium herbarum*, *Journal of Biological Chemistry*, 277, 16512–16516.
- Ferrer, N., Garcia-Espana, A., Jeffers, M., Pellicer, A. (1999) The unr gene: Evolutionary considerations and nucleic acid-binding properties of its long isoform product, *DNA and Cell Biology*, 18, 209–218.
- 39. Varadi, M., Zsolyomi, F., Guharoy, M., Tompa, P., Levy, Y.K. (2015) Functional advantages of conserved intrinsic disorder in RNA-binding proteins, *PLoS One*, **10**, e0139731.
- 40. Kedersha, N., Anderson, P. (2017) Mammalian Stress Granules and Processing Bodies, *Methods in Enzymology*, 431, 61–81.
- 41.Skabkin, M.A., Kiselyova, O.I., Chernov, K.G., Sorokin, A.V., Dubrovin, E.V., Yaminsky, I.V., Vasiliev, V.D., Ovchinnikov, L.P. (2004) Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein

YB-1, Nucleic Acids Research, **32**, 5621–5635.

- 42. Елисеева, И.А., Ким, Е.Р., Гурьянов, С.Г., Овчинников, Л.П., Лябин, Д.Н. (2011) Ү-бокс-связывающий белок 1 (YB-1) и его функции, Успехи биологической химии, 51, 65–132.
- 43. Miwa, A., Higuchi, T., Kobayashi, S. (2006) Expression and polysome association of YB-1 in various tissues at different stages in the lifespan of mice, *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, **1760**, 1675–1681.
- 44. Murray, M.T., Schiller, D.L., Franke, W.W. (1992) Sequence analysis of cytoplasmic mRNA-binding proteins of *Xenopus* oocytes identifies a family of RNA-binding proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **89**, 11–15.
- 45. Berghella, L., De Angelis, L., De Buysscher, T., Mortazavi, A., Biressi, S., Forcales, S., Sirabella, D., Cossu, G., Wold, B. (2008) A highly conserved molecular switch binds MSY-3 to regulate myogenin repression in postnatal muscle, *Genes & Development*, 22, 2125–2138.
- 46. Lima, B., Forrester, M., Hess, D., Stamler, J. (2014) S-Nitrosylation in Cardiovascular Signaling, *Circulation Research*, **106**, 633–646.
- 47. Bernstein, H., Lindquist, J., Keilhoff, G., Dobrowolny, H., Brandt, S., Steiner, J., Bogerts, B., Mertens, P. (2014) Differential distribution of Y-boxbinding protein 1 and cold shock domain protein A in developing and adult human brain, *Brain Structure* and Function, **220**, 2235–2245.
- 48. Lu, Z.H., Books, J.T., Ley, T.J. (2005) YB-1 Is Important for Late-Stage Embryonic Development, Optimal Cellular Stress Responses, and the Prevention of Premature Senescence, *Molecular and Cellular Biology*, 25, 4625–4637.
- 49.Lu, Z.H., Books, J.T., Ley, T.J. (2006) Cold Shock Domain Family

Members YB-1 and MSY4 Share Essential Functions during Murine Embryogenesis, *Molecular and Cellular Biology*, **26**, 8410–8417.

- 50. Lasham, A., Print, C.G., Woolley, A.G., Dunn, S.E., Braithwaite, A.W. (2013) YB-1: Oncoprotein, prognostic marker and therapeutic target?, *Biochemical Journal*, 449, 11–23.
- 51. Prabhu, L., Hartley, A.V., Martin, M., Warsame, F., Sun, E., Lu, T. (2015) Role of post-translational modification of the Y box binding protein 1 in human cancers, *Genes* and Diseases, 2, 240–246.
- 52. Maurya, P., Mishra, A., Yadav, B., Singh, S., Kumar, P., Chaudhary, A., Srivastava, S., Murugesan, S., Mani, A. (2017) Role of Y box protein-1 in cancer: As potential biomarker and novel therapeutic target, *Journal of Cancer*, 8, 1900–1907.
- 53. Morel, C., Kayibanda, B., Scherrer, K. (1971) Proteins associated with globin messenger RNA in avian erythroblasts : isolation and comparison with the proteins bound to nuclear messenger-like RNA, *FEBS Letters*, 18, 84–88.
- 54. Blobel, G. (1972) Protein tightly bound to globin mRNA, *Biochemical* and *Biophysical Research Communi*cations, **47**, 88–95.
- 55. Morel, C., Gander, E.S., Herzberg, M., Dubochet, J., Scherrer, K. (1973) The duck-globin messenger-ribonucleoprotein complex resistance to high ionic strength, particle gel electrophoresis, composition and visualisation by dark-field electron microscopy, *European Journal of Biochemistry*, **36**, 455–464.
- 56.Didier, D.K., Schiffenbauer, J., Woulfe, S.L., Zacheis, M. (1988) Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 85, 7322–7326.

- 57. Hiroshi, S., Toshio, M., Fumio, I., Kunio, Y., Shunsuke, I. (1988) Two human genes isolated by a novel method encode DNA-binding proteins containing a common region of homology, *Gene*, **73**, 499–507.
- 58. Evdokimova, V.M., Wei, C.L., Sitikov, A.S., Simonenko, P.N., Lazarev, O A., Vasilenko, K.S., Ustinov, V.A., Hershey, J.W., Ovchinnikov, L.P. (1995) The major protein of messenger ribonucleoprotein particles in somatic cells is a member of the Y-box binding transcription factor family, *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 3186–3192.
- 59. Скабкин, М.А., Лябин, Д.Н., Овчинников, Л.П. (2006) Неспецифическое и специфическое взаимодействие Y-бокс связывающего белка 1 (YB-1) с мРНК и посттранскрипционная регуляция белкового синтеза в животных клетках, Молекулярная биология, 40, 551–563.
- 60. Yang, X., Zhu, H., Mu, S., Wei, W., Yuan, X., Wang, M., Liu, Y., Hui, J., Huang, Y. (2019) Crystal structure of a Y-box binding protein 1 (YB-1)-RNA complex reveals key features and residues interacting with RNA, *Journal of Biological Chemistry*, 294, 10998–11010.
- 61. Guryanov, S.G., Filimonov, V.V., Timchenko, A.A., Melnik, B.S., Kihara, H., Kutyshenko, V.P., Ovchinnikov, L.P., Semisotnov, G.V. (2013) The major mRNP protein YB-1: Structural and association properties in solution, *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, **1834**, 559–567.
- 62. Wu, S., Fu, X., Huang, J., Jia, T., Zong, F., Mu, S., Zhu, H., Yan, Y., Qiu, S., Wu, Q., Yan, W., Peng, Y., Chen, J., Hui, J. (2015) Genome-wide analysis of YB-1-RNA interactions reveals a novel role of YB-1 in miRNA processing in glioblastoma multiforme, *Nucleic Acids Research*, **43**, 8516–8528.

- 63. Ivanov, P., Emara, M., Villen, J., Gygi, S.P., Anderson P. (2011) Angiogenin-Induced tRNA Fragments Inhibit Translation Initiation, *Molecular Cell*, 43, 613–623.
- 64. Dimartino, D., Colantoni, A., Ballarino, M., Martone, J., Mariani, D., Danner, J., Bruckmann, A., Meister, G., Morlando, M., Bozzoni, I. (2018) The Long Non-coding RNA lnc-31 Interacts with Rock1 mRNA and Mediates Its YB-1-Dependent Translation, *Cell Reports*, 23, 733–740.
- 65. Lyabin, D.N., Eliseeva, I.A., Ovchinnikov, L.P. (2014) YB-1 protein: functions and regulation, *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 5, 95–110.
- 66. Evdokimova, V.M., Kovrigina, E.A., Nashchekin, D.V., Davydova E.K., Hershey J.W.B., Ovchinnikov, L.P. (1998) The major core protein of messenger ribonucleoprotein particles (p50) promotes initiation of protein biosynthesis in vitro, Journal of Biological Chemistry, 273, 3574–3581.
- 67. Ruzanov, P.V., Evdokimova, V.M., Korneeva, N.L., Hershey, J.W.B., Ovchinnikov, L.P. (1999) Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments, *Journal of Cell Science*, **112**, 3487–3496.
- 68. Chernov, K.G., Curmi, P.A., Hamon, L., Mechulam, A., Ovchinnikov, L.P., Pastré, D. (2008) Atomic force microscopy reveals binding of mRNA to microtubules mediated by two major mRNP proteins YB-1 and PABP, *FEBS Letters*, **582**, 2875–2881.
- 69. Jürchott, K., Royer, H., Centrum, M. (2000) Y-box factor YB-1 is associated with the centrosome during mitosis, *Gene Function & Disease*, 1, 57–59.
- 70. Davies, A.H., Barrett, I., Hu, K., Stratford, A.L., Freeman, S., Berquin, I.M., Pelech, S., Hieter, P., Maxwell, C., Dunn, S.E. (2011) YB-1 evokes susceptibility to cancer

through cytokinesis failure , mitotic dysfunction and HER2 amplification, *Oncogene*, **30**, 3649–3660.

- Somasekharan, S.P., El-Naggar, A., Leprivier, G., Cheng, H., Hajee, S., Grunewald, T., Zhang, F., Ng, T., Delattre, O., Evdokimova, V., Wang, Y., Gleave, M., Sorensen, P.H. (2015) YB-1 regulates stress granule formation and tumor progression by translationally activating G3BP1, *Journal of Cell Biology*, 208, 913–929.
- 72. Bounedjah, O., Desforges, B., Wu, T., Pioche-Durieu, C., Marco, S., Hamon, L., Curmi, P., Guerquin-Kern, J., Piétrement, O., Pastré, D. (2014) Free mRNA in excess upon polysome dissociation is a scaffold for protein multimerization to form stress, *Nucleic Acids Research*, 42, 8678–8691.
- 73. Jürchott, K., Bergmann, S., Stein, U., Walther, W., Janz, M., Manni, I., Piaggio, G., Fietze, E., Dietel, M., Royer, H. (2003) YB-1 as a Cell Cycle-regulated Transcription Factor Facilitating Cyclin A and Cyclin B1 Gene Expression, *Journal of Biological Chemistry*, 278, 27988–27996.
- 74. Harada, M., Kotake, Y., Ohhata, T., Kitagawa, K., Niida, H., Matsuura, S., Funai, K., Sugimura, H., Suda, T., Kitagawa, M. (2014) YB-1 promotes transcription of cyclin D1 in human non-small-cell lung cancers, *Genes to Cells*, **19**, 504–516.
- 75. Pagano, C., Martino, O., Ruggiero, G., Guarino, A., Mueller, N., Siauciunaite, R., Reischl, M., Foulkes, N., Vallone, D., Calabrò, V. (2017) The tumor-associated YB-1 protein: new player in the circadian control of cell proliferation, *Oncotarget*, 8, 6193–6205.
- 76. Sorokin, A.V., Selyutina, A.A., Skabkin, M.A., Guryanov, S.G., Nazimov, I.V., Richard, C., Th'Ng, J., Yau, J., Sorensen, P., Ovchinnikov, L.P., Evdokimova, V. (2005) Proteasome-

mediated cleavage of the Y-box-binding protein 1 is linked to DNAdamage stress response, *EMBO Journal*, **24**, 3602–3612.

- 77. Sutherland, B., Kucab, J., Wu, J., Lee, C., Cheang, M., Yorida, E., Turbin, D., Dedhar, S., Nelson, C., Pollak, M., Grimes, H., Miller, K., Badve, S., Huntsman, D., Chen, M., Pallen, C., Dunn, S. (2005) Akt phosphorylates the Y-box binding protein 1 at Ser102 located in the cold shock domain and affects the anchorageindependent growth of breast cancer cells, Oncogene, 24, 4281–4292.
- 78. Basaki, Y., Hosoi, F., Oda, Y., Fotovati, A., Maruyama, Y., Oie, S., Ono, M., Izumi, H., Kohno, K., Sakai, K., Shimoyama, T., Nishio, K., Kuwano, M. (2007) Akt-dependent nuclear localization of Y-box-binding protein 1 in acquisition of malignant characteristics by human ovarian cancer cells, *Oncogene*, **26**, 2736–2746.
- 79. Bogolyubova, I.O., Lyabin, D.N., Bogolyubov, D.S., Ovchinnikov, L.P. (2014) Immunocytochemical study of YB-1 nuclear distribution in different cell types, *Tissue Cell*, 46, 457–461.
- 80. Gonda, K., Wudel, J., Nelson, D., Katoku-Kikyo, N., Reed, P., Tamada, H., Kikyo, N. (2006) Requirement of the protein B23 for nucleolar disassembly induced by the FRGY2a family proteins, *Journal of Biological Chemistry*, 281, 8153–8160.
- 81. Fang, J., Hong, H., Xue, X., Zhu, X., Jiang, L., Qin, M., Liang, H., Gao, L. (2019) A novel circular RNA, circFAT1(e2), inhibits gastric cancer progression by targeting miR-548g in the cytoplasm and interacting with YBX1 in the nucleus, *Cancer Letters*, 442, 222–232.
- 82. Kljashtorny, V., Nikonov, S., Ovchinnikov, L., Lyabin, D., Volodar, N., Curmi, P., Manivet, P. (2015) The cold shock domain of YB-1 segregates RNA from DNA by non-bonded interactions, *PLoS One*, **10**, e0130318.

- Minich, W.B., Maidebura, I.P., Ovchinnikov, L.P. (1993) Purification and characterization of the major 50kDa repressor protein from cytoplasmic mRNP of rabbit reticulocytes, *European Journal of Biochemistry*, 212, 633–638.
- 84. Skabkin, M., Evdokimova, V., Thomas, A., Ovchinnikov, L. (2001) The major messenger ribonucleoprotein particle protein p50 (YB-1) promotes nucleic acid strand annealing, *Journal of Biological Chemistry*, 276, 44841–44847.
- 85. Hasegawa, S., Doetsch, P., Hamilton, K., Martin, A., Okenquist, S., Lenz, J., Boss, J. (1991) DNA binding properties of YB-1 and dbpA: binding to double-stranded, single-stranded, and abasic site containing DNAs, *Nucleic Acids Research*, **19**, 4915–4920.
- 86. Gaudreault, I., Guay, D., Lebel, M. (2004) YB-1 promotes strand separation *in vitro* of duplex DNA containing either mispaired bases or cisplatin modifications, exhibits endonucleolytic activities and binds several DNA repair proteins, *Nucleic Acids Research*, **32**, 316–327.
- 87. Izumi, H., Imamura, T., Nagatani, G., Ise, T., Murakami, T., Uramoto, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Yoshida, Y., Nomoto, M., Okamoto, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Funa, K., Kohno, K. (2001) Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'→5' exonuclease activity, Nucleic Acids Research, 29, 1200–1207.
- 88. Swamynathan, S K., Nambiar, A., Guntaka, R.V. (1998) Role of singlestranded DNA regions and Y-box proteins in transcriptional regulation of viral and cellular genes, *FASEB J.*, 12, 515–522.
- 89. MacDonald, G.H., Itoh-Lindstrom, Y., Ting, J. (1995) The transcriptional regulatory protein, YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA promoter, *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 3527–3533.

- 90. Zasedateleva, O.A., Krylov, A.S., Prokopenko, D.V., Skabkin, M.A., Ovchinnikov, L.P., Kolchinsky, A., Mirzabekov, A.D. (2002) Specificity of mammalian Y-box binding protein p50 in interaction with ss and ds DNA analyzed with generic oligonucleotide microchip, *Journal of Molecular Biology*, **324**, 73–87.
- 91. Wang, N., Yamanaka, K., Inouye, M. (2000) Acquisition of doublestranded DNA-binding ability in a hybrid protein between *Escherichia coli* CspA and the cold shock domain of human YB-1, *Molecular Microbiology*, **38**, 526–534.
- 92. Kretov, D.A., Curmi, P.A., Hamon, L., Abrakhi, S., Desforges, B., Ovchinnikov, L.P., Pastré, D. (2015) mRNA and DNA selection via protein multimerization: YB-1 as a case study, *Nucleic Acids Research*, 43, 9457–9473.
- 93. Mateu-regué, A., Christiansen, J., Bagger, F., Hellriegel, C., Nielsen, F. (2019) Single mRNP analysis by super-resolution microscopy and fluorescence correlation spectroscopy reveals that small mRNP granules represent mRNA singletons, *bioRxiv*, 558098, 1–37.
- 94. Kretov, D., Clément, M., Lambert, G., Durand, D., Lyabin, D., Bollot, G., Bauvais, C., Samsonova, A., Budkina, K., Maroun, R., Hamon, L., Bouhss, A., Lescop, E., Toma, F., Curmi, P., Maucuer, A., Ovchinnikov, L., Pastré, D. (2019) YB-1, an abundant core mRNA-binding protein, has the capacity to form an RNA nucleoprotein filament: a structural analysis, *Nucleic Acids Research*, 47, 3127–3141.
- 95. Prabhu, L., Mundade, R., Wang, B., Wei, H., Hartley, A., Martin, M., McElyea, K., Temm, C., Sandusky, G., Liu, Y., Lu, T. (2015) Critical role of phosphorylation of serine 165 of YBX1 on the activation of NF-κB in colon cancer, *Oncotarget*, 6, 29396–29412.

- 96. Tanabe, Y., Nagatoishi, S., Tsumoto, K. (2015) Molecular biosystems thermodynamic characterization of the interaction between the human Y-box binding protein YB-1 and nucleic acids, *Molecular BioSystems*, **11**, 2441–2448.
- 97. Von Hacht, A., Seifert, O., Menger, M., Schütze, T., Arora, A., Neubauer, P., Wagner, A., Weise, C., Kurreck, J. (2014) Identification and characterization of RNA guaninequadruplex binding proteins, *Nucleic Acids Research*, **42**, 6630–6644.
- 98. Ivanov, P., O'Day, E., Emara, M., Wagner, G., Lieberman, J., Anderson, P. (2014) G-quadruplex structures contribute to the neuroprotective effects of angiogenin-induced tRNA fragments, *Proceedings of the National Academy of Sciences* of the USA, **111**, 18201–18206.
- 99. Mertens, P., Harendza, S., Pollock, A., Lovett, D. (1997) Glomerular Mesangial Cell-specific Transactivation of Matrix Metalloproteinase 2 Transcription Is Mediated by YB-1, *Journal of Biological Chemistry*, 272, 22905–22912.
- 100. En-Nia, A., Yilmaz, E., Klinge, U., Lovett, D., Stefanidis, I., Mertens, P. (2005) Transcription factor YB-1 mediates DNA polymerase α gene expression, *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 7702–7711.
- 101. Rauen, T., Frye, B., Wang, J., Raffetseder, U., Alidousty, C., En-Nia, A., Floege, J., Mertens, P. (2016) Cold shock protein YB-1 is involved in hypoxia-dependent gene transcription, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **478**, 982–987.
- 102. Zou, Y., Chien, K. R. (1995) EFIA/ YB-1 is a component of cardiac HF-1A binding activity and positively regulates transcription of the myosin light-chain 2v gene, *Molecular and Cellular Biology*, **15**, 2972–2982.

- 103. Coles, L.S., Diamond, P., Occhiodoro, F., Vadas, M.A., Shannon, M.F. (2000) An ordered array of cold shock domain repressor elements across tumor necrosis factor-responsive elements of the granulocyte-macrophage colonystimulating factor promoter, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 14482–14493.
- 104. Shi, J., Zheng, B., Li, Y., Sun, Y., Han, A., Zhang, X., Lv, X., Chen, S., Wen, J. (2013) Novel insight into Y-box binding protein 1 in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation through targeting GC box-dependent genes, *FEBS Letters*, **587**, 1326–1332.
- 105. Skabkina, O.V., Lyabin, D.N., Skabkin, M.A., Ovchinnikov, L.P. (2005) YB-1 autoregulates translation of its own mRNA at or prior to the step of 40S ribosomal subunit joining, *Molecular and Cellular Biology*, 25, 3317–3323.
- 106. Lyabin, D.N., Eliseeva, I.A., Skabkina, O.V., Ovchinnikov, L.P. (2011) Interplay between Y-box-binding protein 1 (YB-1) and poly(A) binding protein (PABP) in specific regulation of YB-1 mRNA translation, *RNA Biology*, **8**, 883–892.
- 107. Paranjape, S.M., Harris, E. (2007) Y box-binding protein-1 binds to the dengue virus 3'-untranslated region and mediates antiviral effects, *Journal of Biological Chemistry*, 282, 30497–30508.
- 108. Wei, W.J., Mu, S.R., Heiner, M., Fu, X., Cao, L.J., Gong, X.F., Bindereif, A., Hui, J. (2012) YB-1 binds to CAUC motifs and stimulates exon inclusion by enhancing the recruitment of U2AF to weak polypyrimidine tracts, *Nucleic Acids Research*, 40, 8622–8636.
- 109. Yanshina, D., Kossinova, O., Gopanenko, A., Krasheninina, O., Malygin, A., Venyaminova, A., Karpova, G. (2017) Structural fea-

tures of the interaction of the 3'-untranslated region of mRNA containing exosomal RNA-specific motifs with YB-1, a potential mediator of mRNA sorting, *Biochimie*, **144**, 134–143.

- 110. Ashizuka, M., Fukuda, T., Nakamura, T., Shirasuna, K., Iwai, K., Izumi, H., Kohno, K., Kuwano, M., Uchiumi, T. (2002) Novel Translational Control through an Iron-Responsive Element by Interaction of Multifunctional Protein YB-1 and IRP2, *Molecular and Cellular Biology*, **22**, 6375–6383
- 111. Evdokimova, V., Tognon, C., Ng, T., Ruzanov, P., Melnyk, N., Fink, D., Sorokin, A., Ovchinnikov, L.P., Davicioni, E., Triche, TJ., Sorensen, P.H.B. (2009) Translational activation of Snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition, *Cancer Cell*, **15**, 402–405.
- 112. Goodarzi, H., Liu, X., Nguyen, H., Zhang, S., Fish, L., Tavazoie, S. (2015) Endogenous tRNA-derived fragments suppress breast cancer progression via YBX1 displacement, *Cell*, **161**, 790–802.
- 113. Ray, D., Kazan, H., Chan, E.T., Castillo, L.P., Chaudhry, S., Talukder, S., Blencowe, B.J., Morris, Q., Hughes, T.R. (2009) Rapid and systematic analysis of the RNA recognition specificities of RNAbinding proteins, *Nature Biotechnology*, 27, 667–670.
- 114. Matsumoto, K.I., Abiko, S., Ariga, H. (2005) Transcription regulatory complex including YB-1 controls expression of mouse matrix metalloproteinase-2 gene in NIH3T3 cells, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 1500–1504.
- 115. Gomes, C., Merianda, T., Lee, S., Yoo, S., Twiss, J. (2014) Molecular determinants of the axonal mRNA transcriptome, *Developmental Neu*robiology, 74, 218–232.

- 116. Shurtleff, M., Temoche-Diaz, M., Karfilis, K., Ri, S., Schekman, R. (2016) Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction, *Elife*, **5**, 1–23.
- 117. Evdokimova, V., Ruzanov, P., Imataka, H., Raught, B., Svitkin, Y., Ovchinnikov, L.P., Sonenberg, N. (2001) The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' capdependent mRNA stabilizer, *EMBO Journal*, **20**, 5491–5502.
- 118. Nekrasov, M., Ivshina, M., Chernov, K., Kovrigina, E., Evdokimova, V., Thomas, A., Hershey, J., Ovchinnikov, L.P. (2003) The mRNA-binding protein YB-1 (p50) prevents association of the eukaryotic initiation factor eIF4G with mRNA and inhibits protein synthesis at the initiation stage, *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 13936–13943.
- 119. Hayakawa, H., Uchiumi, T., Fukuda, T., Ashizuka, M., Kohno, K., Kuwano, M., Sekiguchi, M. (2002) Binding capacity of human YB-1 protein for RNA containing 8-oxoguanine, *Biochemistry*, **41**, 12739–12744.
- 120. Chen, X., Li, A., Sun, B., Yang, Y., Han, Y., Yuan, X., Chen, R., Wei, W., Liu, Y., Gao, C., Chen, Y., Zhang, M., Ma, X., Liu, Z., Luo, J., Lyu, C., Wang, H., Ma, J., Zhao, Y., Zhou, F., Huang, Y., Xie, D., Yang, Y. (2019) 5-methylcytosine promotes pathogenesis of bladder cancer through stabilizing mRNAs, *Nature Cell Biology*, **21**, 978–990.
- 121. Yang, Y., Wang, L., Han, X., Yang, W., Zhang, M., Ma, H., Sun, B., Li, A., Xia, J., Chen, J., Heng, J., Wu, B., Chen, Y., Xu, J., Yang, X., Yao, H., Sun, J., Lyu, C., Wang, H., Huang, Y., Sun, Y., Zhao, Y., Meng, A., Ma, J., Liu, F., Yang, Y. (2019) RNA 5-methylcytosine facilitates the maternal-to-zygotic transition by preventing maternal

mRNA decay, *Molecular Cell*, **75**, 1–15.

- 122. Coles, L.S., Lambrusco, L., Burrows, J., Hunter, J., Diamond, P., Bert, A.G., Vadas, M.A., Goodall, G.J. (2005). Phosphorylation of cold shock domain/Y-box proteins by ERK2 and GSK3β and repression of the human VEGF promoter. *FEBS Letters*, **579**, 5372–5378.
- 123. Evdokimova, V., Ruzanov, P., Anglesio, M., Sorokin, A., Ovchinnikov, L., Buckley, J., Triche, T., Sonenberg, N., Sorensen, P. (2006) Akt-mediated YB-1 phosphorylation activates translation of silent mRNA species, *Molecular and Cellular Biology*, 26, 277–292.
- 124. Wang, J., Gibbert, L., Djudjaj, S., Alidousty, C., Rauen, T., Kunter, U., Rembiak, A., Enders, D., Jankowski, V., Braun, G., Floege, J., Ostendorf, T., Raffetseder, U. (2016) Therapeutic nuclear shuttling of YB-1 reduces renal damage and fibrosis, *Kidney International*, **90**, 1226–1237.
- 125. Martin, M., Hua, L., Wang, B., Wei, H., Prabhu, L., Hartley, A.V., Jiang, G., Liu, Y., Lu, T. (2017) Novel Serine 176 phosphorylation of YBX1 activates NF-κB in colon cancer, *Journal of Biological Chemistry*, **292**, 3433–3444.
- 126. Alidousty, C., Rauen, T., Hanssen, L., Wang, Q., Alampour-Rajabi, S., Mertens, P.R., Bernhagen, J., Floege, J., Ostendorf, T., Raffetseder, U. (2014) Calcineurin-mediated YB-1 dephosphorylation regulates CCL5 expression during monocyte differentiation, *Journal of Biological Chemistry*, **289**, 21401–21412.
- 127. Liu, Q., Tao, T., Liu, F., Ni, R., Lu, C., Shen, A. (2016) Hyper-O-GlcNAcylation of YB-1 affects Ser102 phosphorylation and promotes cell proliferation in hepatocellular carcinoma, *Experimental Cell Research*, **349**, 230–238.

- 128. Alemasova, E., Pestryakov, P., Sukhanova, M., Kretov, D., Moor, N., Curmi, P., Ovchinnikov, L., Lavrik, O. (2015) Poly(ADP-ribosyl)ation as a new posttranslational modification of YB-1, *Biochimie*, **119**, 36–44.
- 129. Alemasova, E.E., Lavrik, O.I. (2019) Poly (ADP-ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins, *Nucleic Acids Research*, 47, 3811–3827.
- Bobkova, N.V., Lyabin, D.N., Medvinskaya, N.I., Samokhin, A.N., Nekrasov, P.V., Nesterova, I.V., Aleksandrova, I.Y., Tatarnikova, O.G., Bobylev, A.G., Vikhlyantsev, I.M., Kukharsky, M.S., Ustyugov, A.A., Polyakov, D.N., Eliseeva, I.A., Kretov, D.A., Guryanov, S.G., Ovchinnikov, L.P. (2015) The Y-box binding protein 1 suppresses Alzheimer's disease progression in two animal models, *PLoS One*, 10, e0138867.
- Tsialikas, J., Romer-Seibert J. (2015) LIN28: roles and regulation in development and beyond, *Development*, 142, 2397–2404.
- 132. Piskounova, E., Polytarchou, C., Thornton, J.E., LaPierre, R.J., Pothoulakis, C., Hagan, J.P., Iliopoulos, D., Gregory, R.I. (2011) Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms, *Cell*, **147**, 1066–1079.
- 133. Wang, L., Nam, Y., Lee, A.K., Yu, C., Roth, K., Chen, C., Ransey, E.M., Sliz, P. (2017) LIN28 zinc knuckle domain is required and sufficient to induce let-7 oligouridylation, *Cell Reports*, 18, 2664–2675.
- 134. Hafner, M., Max, K.E., Bandaru, P., Morozov, P., Gerstberger, S., Brown, M., Molina, H., Tuschl, T. (2013) Identification of mRNAs bound and regulated by human LIN28 proteins and molecular requirements for RNA recognition, *RNA*, **19**, 613–626.

- 135. Shinoda, G., Shyh-Chang, N., Soysa, T.Y.D., Zhu, H., Seligson, M.T., Shah, S.P., Abo-Sido, N., Yabuuchi, A., Hagan, J.P., Gregory, R.I., Asara, J.M., Cantley, L.C., Moss, E.G., Daley, G.Q. (2013) Fetal deficiency of Lin28 programs life-long aberrations in growth and glucose metabolism, *Stem Cells*, **31**, 1563–1573.
- 136. Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson, J.A. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, *Science*, **318**, 1917–1920.
- 137. Zhang, J., Ratanasirintrawoot, S., Chandrasekaran, S., Wu, Z., Ficarro, S. B., Yu, C., Ross, C.A., Cacchiarelli, D., Xia, Q., Seligson, M., Shinoda, G., Xie, W., Cahan, P., Wang, L., Ng, S.-C., Tintara, S., Trapnell, C., Onder, T., Loh, Y.-H., Mikkelsen, T., Sliz, P., Teitell, M., Asara, J.M., Marto, J.A., Li, H., Collins, J., Daley, G.Q. (2016) LIN28 regulates stem cell metabolism and conversion to primed pluripotency, *Cell Stem Cell*, **19**, 66–80.
- 138. Hamano, R., Miyata, H., Yamasaki, M., Sugimura, K., Tanaka, K., Kurokawa, Y., Nakajima, K., Takiguchi, S., Fujiwara, Y., Mori, M., Doki, Y. (2012) High expression of Lin28 is associated with tumour aggressiveness and poor prognosis of patients in oesophagus cancer, *British Journal of Cancer*, **106**, 1415–1423.
- Wang, T., Wang, G., Hao, D., Liu, X., Wang, D., Ning, N., Li, X. (2015) Aberrant regulation of the LIN28A/LIN28B and let-7 loop in human malignant tumors and its effects on the hallmarks of cancer, *Molecular Cancer*, 14, 125.

- 140. Jiang, S., Baltimore, D. (2016) RNA-binding protein Lin28 in cancer and immunity, *Cancer Letters*, 375, 108–113.
- 141. Zhu, H., Shyh-Chang, N., Segrè, A.V., Shinoda, G., Shah, S.P., Einhorn, W.S., Takeuchi, A., Engreitz, J.M., Hagan, J.P., Kharas, M.G., Urbach, A., Thornton, J.E., Triboulet, R., Gregory, R.I., DIAGRAM Consortium, MAGIC Investigators, Altshuler, D., Daley, G.Q. (2011) The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism, *Cell*, 147, 81–94.
- 142. Docherty, C.K., Salt, I.P., Mercer, J.R. (2016) Lin28A induces energetic switching to glycolytic metabolism in human embryonic kidney cells, *Stem Cell Research & Therapy*, 7, 78.
- 143. Ambros, V., Horvitz, H. R. (1984) Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Science*, 226, 409–416.
- 144. Moss, E.G., Lee, R.C., Ambros, V. (1997) The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the lin-4 RNA, *Cell*, 88, 637–646.
- 145. Yermalovich, A.V., Osborne, J.K., Sousa, P., Han, A., Kinney, M.A., Chen, M.J., Robinton, D.A., Montie, H., Pearson, D.S., Wilson, S.B., Combes, A.N., Little, M.H., Daley, G.Q. (2019) Lin28 and let-7 regulate the timing of cessation of murine nephrogenesis, *Nature Communications*, **10**, 168.
- 146. Worringer, K.A., Rand, T.A., Hayashi, Y., Sami, S., Takahashi, K., Tanabe, K., Narita, M., Srivastava, D., Yamanaka, S. (2014) The let-7/LIN-41 pathway regulates reprogramming to human induced pluripotent stem cells by controlling expression of prodifferentiation genes, *Cell Stem Cell*, 14, 40–52.
- 147. Newman, M.A., Thomson, J.M., Hammond, S.M. (2008) Lin-28

interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing, *RNA*, **14**, 1539–1549.

- 148. Wiswanathan, S.R., Daley, G.Q., Gregory, R.I. (2008) Selective blockade of microRNA processing by Lin28, *Science*, **320**, 97–100.
- 149. Rybak, A., Fuchs, H., Smirnova, L., Brandt, C., Pohl, E.E., Nitsch, R., Wulczyn, F.G. (2008) A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment, *Nature Cell Biology*, **10**, 987–993.
- 150. Heo, I., Joo, C., Cho, J., Ha, M., Han, J., Kim, V.N. (2008) Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA, *Molecular Cell*, **32**, 276–284.
- 151. Heo, I., Joo, C., Kim, Y. K., Ha, M., Yoon, M. J., Cho, J., Kim, V.N. (2009) TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation, *Cell*, **138**, 696–708.
- 152. Chang, H.M., Triboulet, R., Thornton, J.E., Gregory, R.I. (2013) A role for the Perlman syndrome exonuclease Dis312 in the Lin28–let-7 pathway, *Nature*, **497**, 244–248.
- 153. Nam, Y., Chen, C., Gregory, R.I., Chou, J.J., Sliz, P. (2011) Molecular basis for interaction of let-7 microRNAs with Lin28, *Cell*, 147, 1080–1091.
- 154. Mayr, F., Schütz, A., Döge, N., Heinemann, U. (2012) The Lin28 cold-shock domain remodels prelet-7 microRNA, *Nucleic Acids Research*, 40, 7492–7506.
- 155. Triboulet, R., Pirouz, M., Gregory, R.I. (2015) A single let-7 microRNA bypasses LIN28-mediated repression, *Cell Reports*, **13**, 260–266.
- 156. Zhang, C., Darnell, R.B. (2011) Mapping in vivo protein-RNA interactions at single-nucleotide resolution from HITS-CLIP data, *Nature Biotechnology*, **29**, 607–614.

- 157. Weyn-Vanhentenryck, S.M., Mele, A., Yan, Q., Sun, S., Farny, N., Zhang, Z., Xue, C., Herre, M., Silver, P.A., Zhang, M.Q., Krainer, A.R., Darnell, R.B., Zhang, C. (2014) HITS-CLIP and integrative modeling define the Rbfox splicingregulatory network linked to brain development and autism, *Cell Reports*, 6, 1139–1152.
- 158. Shah, A., Qian, Y., Weyn-Vanhentenryck, S.M., Zhang, C. (2016) CLIP Tool Kit (CTK): a flexible and robust pipeline to analyze CLIP sequencing data, *Bioinformatics*, 33, 566–567.
- 159. Cho, J., Chang, H., Kwon, S.C., Kim, B., Kim, Y., Choe, J., Ha, M., Kim K.Y., Kim, V.N. (2012) LIN28A is a suppressor of ER-associated translation in embryonic stem cells, *Cell*, **151**, 765–777.
- 160. Van Nostrand, E.L., Pratt, G.A., Shishkin, A. A., Gelboin-Burkhart, C., Fang, M.Y., Sundararaman, B., Blue, S.M., Nguyen, T.B., Surka, C., Elkins, K., Stanton, R., Rigo, F., Guttman, M., Yeo, G.W. (2016) Robust transcriptome-wide discovery of RNA-binding protein binding sites with enhanced CLIP (eCLIP), *Nature Methods*, 13, 508–514.
- 161. Ustianenko, D., Chiu, H.S., Treiber, T., Weyn-Vanhentenryck, S.M., Treiber, N., Meister, G., Sumazin, P., Zhang, C. (2018) LIN28 selectively modulates a subclass of let-7 microRNAs, *Molecular Cell*, 71, 271–283.
- 162. Nowak, J.S., Choudhury, N.R., de Lima Alves, F., Rappsilber, J., Michlewski, G. (2014) Lin28a regulates neuronal differentiation and controls miR-9 production, *Nature Communications*, 5, 3687.
- 163. Nowak, J.S., Hobor, F., Velasco, A.D.R., Choudhury, N.R., Heikel, G., Kerr, A., Ramos, A., Michlewski, G. (2017) Lin28a uses distinct mechanisms of binding to RNA and

affects miRNA levels positively and negatively, *RNA*, **23**, 317–332.

- 164. Tan, F.E., Sathe, S., Wheeler, E.C., Nussbacher, J.K., Peter, S., Yeo, G.W. (2019) A Transcriptome-wide Translational Program Defined by LIN28B Expression Level, *Molecular Cell*, **73**, 304–313.
- 165. Wilbert, M.L., Huelga, S.C., Kapeli, K., Stark, T.J., Liang, T.Y., Chen, S.X., Yan, B.Y., Nathanson, J.L., Hutt, K.R., Lovci, M.T., Kazan, H., Vu, A.Q., Massirer, K.B., Morris, Q., Hoon, S., Yeo, G.W. (2012) LIN28 binds messenger RNAs at GGAGA motifs and regulates splicing factor abundance, *Molecular Cell*, 48, 195–206.
- 166. Graf, R., Munschauer, M., Mastrobuoni, G., Mayr, F., Heinemann, U., Kempa, S., Rajewsky, N., Land-thaler, M. (2013) Identification of LIN28B-bound mRNAs reveals features of target recognition and regulation, *RNA Biology*, **10**, 1146–1159.
- 167. Hafner, M., Max, K.E., Bandaru, P., Morozov, P., Gerstberger, S., Brown, M., Molina, H., Tuschl, T. (2013) Identification of mRNAs bound and regulated by human LIN28 proteins and molecular requirements for RNA recognition, *RNA*, **19**, 613–626.
- 168. Peng, S., Chen, L.L., Lei, X.X., Yang, L., Lin, H., Carmichael, G.G., Huang, Y. (2011) Genome-wide studies reveal that Lin28 enhances the translation of genes important for growth and survival of human embryonic stem cells, *Stem Cells*, 29, 496–504.
- 169. Shyh-Chang N., Daley G.Q. (2013) Lin28: primal regulator of growth and metabolism in stem cells, *Cell Stem Cell*, **12**, 395–406.
- 170. Rigbolt, K.T., Prokhorova, T.A., Akimov, V., Henningsen, J., Johansen, P.T., Kratchmarova, I., Kassem M., Mann M., Olsen J.V., Blagoev, B. (2011) System-wide temporal

characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation, *Science Signaling*, **4**, rs3–rs3.

- 171. Van Hoof, D., Muñoz, J., Braam, S. R., Pinkse, M.W., Linding, R., Heck, A.J., Mummery C.L., Krijgsveld, J. (2009) Phosphorylation dynamics during early differentiation of human embryonic stem cells, *Cell Stem Cell*, **5**, 214–226.
- 172. Tsanov, K.M., Pearson, D.S., Wu, Z., Han, A., Triboulet, R., Seligson, M.T., Powers, J.T., Osborne, J.K., Kane, S., Gygi, S.P., Gregory, R.I., Daley G.Q. (2017) LIN28 phosphorylation by MAPK/ERK couples signalling to the post-transcriptional control of pluripotency, *Nature Cell Biology*, **19**, 60–67.
- 173. Zeng, Y., Yao, B., Shin, J., Lin, L., Kim, N., Song, Q., Liu, S., Su, Y., Guo, J.U., Huang, L., Wan, J., Wu, H., Qian, J., Cheng, X., Zhu, H., Ming, G.-L., Jin, P., Song, H. (2016) Lin28A binds active promoters and recruits Tet1 to regulate gene expression, *Molecular Cell*, 61, 153–160.
- 174. Karlson, D., Imai, R. (2003) Conservation of the cold shock domain protein family in plants, *Plant Physiology*, **131**, 12–15.
- 175. Sasaki, K., Imai, R. (2012) Pleiotropic roles of cold shock domain proteins in plants, *Frontiers in Plant Science*, **2**, 116.
- 176. Karlson, D., Nakaminami, K., Thompson, K., Yang, Y., Chaikam, V., Mulinti, P., (2009) Plant coldshock domain proteins: on the tip of an Iceberg. *Plant Cold Hardiness: From the Laboratory to the Field.* Cambridge: CABI, 43–54 pp.
- 177. Таранов, В.В., Злобин, Н.Е., Евлаков, К.И., Шамустакимова, А.О., Бабаков, А.В. (2018) Вклад доменной структуры белков с доменом холодового шока растения Eutrema salsugineum во взаи-

модействие с РНК, *Биохимия*, **83**, 1369–1379.

- 178. Fusaro, A.F., Bocca, S.N., Ramos, R.L.B., Barrôco, R.M., Magioli, C., Jorge, V.C., Coutinho, T.C., Rangel-Lima, C.M., De Rycke, R., Inze, D., Engler, G., Sachetto-Martins, G. (2007) AtGRP2, a cold-induced nucleo-cytoplasmic RNA-binding protein, has a role in flower and seed development, *Planta*, **225**, 1339–1351.
- 179. Yang, Y., Karlson, D. (2013) AtCSP1 regulates germination timing promoted by low temperature, *FEBS Letters*, **587**, 2186–2192.
- 180. Kim, M.H., Sasaki, K., Imai, R. (2009) Cold shock domain protein 3 regulates freezing tolerance in Arabidopsis thaliana, Journal of Biological Chemistry, 284, 23454–23460.
- 181. Таранов, В.В., Бердникова, М.В., Носов, А.В., Галкин, А.В., Бабаков, А.В. (2010) Белки с доменом холодового шока в растенииэкстремофите *Thellungiella sal*suginea: структура генов и их дифференцированная экспрессия при холодовой адаптации, Молекулярная биология, 44, 889–897.
- 182. Radkova, M., Vítámvás, P., Sasaki, K., Imai, R. (2014) Development- and cold-regulated accumulation of cold shock domain proteins in wheat, *Plant Physiology and Biochemistry*, **77**, 44–48.
- 183. Chaikam, V., Karlson, D. (2008) Functional characterization of two cold shock domain proteins from *Oryza sativa*. *Plant, Cell & Environment*, **31**, 995–1006.
- 184. Nakaminami, K., Hill, K., Perry, S.E., Sentoku, N., Long, J.A., Karlson, D.T. (2009) *Arabidopsis* cold shock domain proteins: relationships to floral and silique development, *Journal of Experimental Botany*, **60**, 1047–1062.

- 185. Yang, Y., Karlson, D.T. (2011) Overexpression of AtCSP4 affects late stages of embryo development in *Arabidopsis, Journal of Experimental Botany*, **62**, 2079–2091.
- 186. Nakaminami, K., Karlson, D.T., Imai, R. (2006) Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **103**, 10122–10127.
- 187. Park, S.J., Kwak, K.J., Oh, T.R., Kim, Y.O., Kang, H. (2009) Cold shock domain proteins affect seed germination and growth of *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions, *Plant and Cell Physiology*, **50**, 869–878.
- 188. Sasaki, K., Kim, M. H., Imai, R. (2007) Arabidopsis COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN2 is a RNA chaperone that is regulated by cold and developmental signals, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **364**, 633–638.
- 189. Zlobin, N., Evlakov, K., Alekseev, Y., Blagodatskikh, K., Babakov, A., Taranov, V. (2016) High DNA melting activity of extremophyte *Eutrema salsugineum* cold shock domain proteins EsCSDP1 and EsCSDP3, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 5, 502–508.
- 190. Zlobin, N., Evlakov, K., Tikhonova, O., Babakov, A., Taranov, V. (2018) RNA melting and RNA chaperone activities of plant cold shock do-

main proteins are not correlated, *RNA Biology*, **15**, 1040–1046.

- 191. Злобин, Н. Е. (2019) Взаимодействие белков с доменом холодового шока растения-экстремофита Eutrema Salsugineum с нуклеиновыми кислотами: Диссертация на соискание ученой степени канд. биол. наук. М.: ФГБНУ ВНИИСБ, 124 с.
- 192. Juntawong, P., Sorenson, R., Bailey-Serres, J. (2013) Cold shock protein 1 chaperones mRNAs during translation in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Journal*, **74**, 1016–1028.
- 193. Kawaguchi, R., Bailey-Serres, J. (2005) mRNA sequence features that contribute to translational regulation in Arabidopsis, *Nucleic Acids Research*, 33, 955–965.
- 194. Puckette, M., Iyer, N.J., Tang, Y., Dai, X.B., Zhao, P., Mahalingam, R. (2012) Differential mRNA translation in *Medicago truncatula* accessions with contrasting responses to ozone-induced oxidative stress, *Molecular Plant*, 5, 187–204.
- 195. Li, C., Sako, Y., Imai, A., Nishiyama, T., Thompson, K., Kubo, M., Hiwatashi, Y., Kabeya, Y., Karlson, D., Wu, S., Ishikawa, M., Murata, T., Benfey, P., Sato, Y., Tamada, Y., Hasebe, M. (2017). A Lin28 homologue reprograms differentiated cells to stem cells in the moss *Physcomitrella patens*, *Nature Communications*, 8, 14242.