

DNA 聚合酶 δ 结合蛋白 38 是 microRNA-291a-5p 的一个靶基因

林德球, 林辽华

华南师范大学生命科学学院, 广州 510631

摘要: DNA 聚合酶 δ 结合蛋白 38 (DNA Polymerase delta-interacting protein 38, PDIP38) 是 2003 年新鉴定的一个基因, 目前认为其可能在 DNA 修复、有丝分裂以及血管平滑肌细胞迁移中起重要作用。根据本实验室前期在胚胎干细胞中对该基因的研究, 认为 microRNA 可能在 PDIP38 的调控过程中发挥了重要作用。为证实这种推论, 运用生物信息学方法预测发现在胚胎干细胞中高表达的 microRNA——microRNA-291a-5p (miR-291a-5p) 与 PDIP38 的开放阅读框 (ORF) 有一个配对非常理想的靶位点, 通过构建该靶位点的报告基因载体以及 ORF 表达载体, 分别进行荧光素酶报告基因分析以及细胞转染和 Western blotting 方法。结果证明 miR-291a-5p 能够直接调节 PDIP38 的蛋白表达。进一步运用 real-time PCR 和 Western blotting 分析证明了在胚胎干细胞中 miR-291a-5p 能够调节内源 PDIP38 的蛋白表达而对其 mRNA 表达无影响, 这些都证明 PDIP38 确实是 miR-291a-5p 的一个靶基因。

关键词: microRNA, miR-291a-5p, PDIP38, 胚胎干细胞

DNA polymerase delta-interacting protein 38 is a target gene of microRNA-291a-5p

Deqiu Lin, and Liaohua Lin

College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Abstract: DNA polymerase delta-interacting protein 38 (PDIP38) was identified in 2003 as a human DNA polymerase delta interacting protein which plays important roles in DNA repair, mitosis and vascular smooth muscle cells (VSMCs) migration. Our previous study showed that PDIP38 was expressed in mouse embryonic stem (ES) cells and upregulated in protein levels after differentiation from ES cells, while the expression in mRNA levels was not changed. We supposed that microRNA played key roles in the regulation of PDIP38 and the differentiation of ES cells. By bioinformatics assay, we predicted that PDIP38 was a potential target of microRNA-291a-5p (miR-291a-5p). Furthermore, we validated the possibility of miR-291a-5p to regulate the protein expression of PDIP38. Using luciferase reporter assay, realtime PCR and western blot methods, we firstly demonstrated that miR-291a-5p directly inhibited the expression of PDIP38. The present results shed a new light on the study of PDIP38 and miR-291a-5p in the differentiation of ES cells.

Keywords: microRNA, miR-291a-5p, PDIP38, embryonic stem cell

Received: February 9, 2010; **Accepted:** May 20, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30430490).

Corresponding author: Deqiu Lin. Tel/Fax: +86-20-85214720; E-mail: lindq168@sncnu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30430490) 资助。

MicroRNA (miRNA) 是一类约 22 nt 的高度保守的非编码 RNA 分子。在动物中, miRNA 主要以不完全配对的方式结合到靶基因 3'非翻译区(3'UTR)的多个互补位点,在转录后水平沉默其靶基因的表达。在植物中, miRNA 主要以完全或几乎完全配对的方式结合到靶基因编码区的互补位点,引起 mRNA 降解^[1-2]。

miRNA 参与包括发育、分化、增殖、凋亡和机体病变等多种生理过程,其异常表达会导致发育缺陷、癌症、肥胖、早发性痴呆等多种疾病的产生^[3-6]。和许多 mRNA 类似, miRNA 的表达也具有时空特异性^[3,7-8]。近年来的研究发现, miRNA 在干细胞的自我更新、分化及其子代细胞的分化中发挥了重要的作用。在胚胎干细胞,精原干细胞和各种体组织干细胞中, miRNA 也发挥了类似的功能^[9-10]。

PDIP38 是 DNA 聚合酶 δ 结合蛋白 38 (DNA Polymerase delta-interacting protein 38) 的缩写。PDIP38 是一个新鉴定的基因^[11],因而目前的研究比较少。PDIP38 可以和增殖性细胞核抗原 (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 结合^[11]。PCNA 也可以和 DNA 聚合酶 δ 结合。在 DNA 复制过程中, PCNA 募集 DNA 聚合酶 δ 到 DNA 上修复损伤的 DNA,以提高前导链的合成效率^[12]。此外, PDIP38 也和线粒体内 DNA 类核的一些组成蛋白结合,并且在整个有丝分裂的过程中, PDIP38 都定位于有丝分裂的纺锤体^[13-14]。最新的研究则证明 PDIP38 在血管平滑肌细胞 (VMSCs) 迁移中发挥关键作用^[15]。在前期的研究中,我们在 mRNA 和蛋白水平上分别检测了小鼠胚胎干细胞中 PDIP38 的表达,发现 PDIP38 在胚胎干细胞中有表达,同时在胚胎干细胞形成类胚体发生分化以后其蛋白表达水平显著增高,而 mRNA 水平则未见有明显的变化。根据对 PDIP38 的初步研究结果,我们认为很可能 miRNA 在 PDIP38 的表达调节中发挥了重要的作用。由此我们对 PDIP38 进行了 miRNA 结合位点的生物信息学预测,发现在 PDIP38 的开放阅读框 (ORF) 末尾处有一个和 microRNA-291a-5p (miR-291a-5p) 配对非常理想的靶位点,而有研究者已经证实 miR-291a 的基因簇成员在胚胎干细胞中

高表达,并且在细胞周期调节中具有重要作用^[16-17]。

根据以上的研究背景和生物信息学预测的结果,我们认为 miR-291-5a 很有可能调节 PDIP38 蛋白的表达,进而影响胚胎干细胞的分化。通过荧光素酶报告基因分析、real-time PCR 以及 Western blotting 分析等方法我们证实了 PDIP38 确实是 miR-291-5a 的一个靶基因。

1 材料与方法

1.1 载体构建

从小鼠的大脑 cDNA 文库中扩增出 PDIP38 的 961~1 860 bp 和 1 101~1 860 bp 两个片段以及它的 ORF 区域。分别克隆到 pMIR-REPORT 载体 (Ambion) 的荧光素酶基因后面的 *Xho* I 位点和 *Sac* I 位点之间以及 C 端带有 Flag 标签的 pCDNA3.1 载体的 *Xba* I 和 *Sal* I 位点之间。具体如下,在 50 μ L 体系中加入 5 μ L 10 \times KOD Plus PCR buffer, 5 μ L 2 mmol/L 的 dNTPs, 2 μ L 25 mmol/L $MgCl_2$, 20 μ mol/L 的正反向引物各 1 μ L, cDNA 模板 1 μ L, KOD Plus 1 μ L (TOYOBO), 用水补至 50 μ L。PCR 程序为: 94 $^{\circ}C$ 变性 2 min; 94 $^{\circ}C$ 30 s, 60 $^{\circ}C$ 30 s, 72 $^{\circ}C$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}C$ 5 min。PCR 产物琼脂糖电泳后,用琼脂糖凝胶回收试剂盒 (上海生工) 回收目的条带。对于靶位点的克隆,回收片段及 pMIR-REPORT 用 *Xho* I 和 *Hind* III (TaKaRa) 双酶切, 37 $^{\circ}C$ 消化 2 h; 对于 ORF 的克隆, PCR 片段及载体用 *Xba* I 和 *Sal* I (TaKaRa) 双酶切。酶切产物用 PCR 回收试剂盒 (上海生工) 回收。载体和片段的连接用 T4 DNA 连接酶 (Fermentas) 在 16 $^{\circ}C$ 进行。连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,挑阳性克隆用 PCR 进行鉴定,并送华大基因公司测序确认。用高纯度质粒小抽试剂盒 (北京天根) 提取转录级的质粒。扩增片段所用的引物见表 1。

1.2 细胞培养及转染

报告基因分析采用的细胞为 293T 细胞,用含 10% 胎牛血清 (Invitrogen) 的高糖 DMEM 培养基 (Invitrogen) 培养。采用小鼠胚胎干细胞 R1 细胞系,进行 Western blotting 检测内源基因表达 ES 细胞培养在 0.1% 明胶 (Sigma) 铺盘的经丝裂霉素

表 1 文中所用的引物序列

Table 1 The primer sequences in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
target+forward	GTCGAGCTCCCAGTATAGCAGCCATGTCTCTC
target-forward	GTCGAGCTCCACCCTCAGGCCTTCACTGGTA
target+/target-reverse	GACGAGCTCAGTCCAATTCTCTGGCTCTGT
ORF forward	GAGTCTAGAATGGCTGGTTGTGTGGCCCC
ORF reverse	GAGGTCGACCTACCAGTGAAGGCCTGAGGGT
PDIP38 forward	GACAGTTGGTGTGTTGAGGT
PDIP38 reverse	GGTAGTAAGTGTGAGTTTGGC
GAPDH forward	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG
GAPDH reverse	TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT

(上海生工) 处理后的单层小鼠胚胎成纤维 (Mouse embryonic fibroblasts, MEF) 细胞上, 培养液成分为含有 10% 胎牛血清 (Gibco)、2 mmol/L 谷氨酸 (Gibco)、0.1 mmol/L β -巯基乙醇 (Gibco)、白血病抑制因子 (Leukemia inhibitory factor, LIF, Chemicon 公司) 的 DMEM 培养液, 每天换液, 隔天传代。ES 细胞在 0.1% 明胶铺盘的皿中传代 1 次, 以去除 MEF 细胞。MEF 细胞的培养基为含 10% 胎牛血清的 DMEM。转染前 1 天, 接种到 24 孔培养板中。miRNA mimic 及 miRNA inhibitor (广州锐博生物科技有限公司) 的转染终浓度为 50 nmol/L。进行报告基因分析时, 同时转入 50 ng/孔的 pMIR-REPORT3-target⁺ 或 pMIR-REPORT3-target⁻, 及 20 ng/孔的 pRL-TK。转染 24 h 后, 进行荧光素酶活性, 荧光定量 PCR 及 Western blotting 分析。本文中所述的转染方法为脂质体转染法, 转染试剂为 lipofectamine 2000 (Invitrogen), 在 293T 细胞中的转染效率能够稳定在 90% 左右。

1.3 报告基因分析

报告基因检测使用 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) 试剂盒在单管光度计 Promega GloMax 20/20n 上进行。实验操作按试剂盒及仪器的操作说明进行。具体如下, 收获的细胞用 PBS 缓冲液清洗 2 次, 在 24 孔板的每孔中加入 100 μ L PLB 裂解液, 室温下在摇床上温和摇动 15 min。设定测试方案为双荧光检测, 2 个荧光的读

值时间均为 10 s。取 20 μ L 细胞裂解液到 1.5 mL 的离心管中, 加入 100 μ L LAR II 底物, 混匀, 读取萤火虫荧光酶活性, 随后加入 100 μ L Stop & Glo 试剂, 混匀, 读取海肾荧光素酶活性。以肾荧光素酶活性为参照, 计算萤火虫荧光酶的相对活性。

1.4 总 RNA 抽提及实时荧光定量 PCR

收获 24 孔板中的细胞, 吸去培养基, 每孔加入 200 μ L Trizol (Invitrogen), 在摇床上混匀 10 min, 将细胞裂解物转移到 1.5 mL 的离心管中。加入 40 μ L 氯仿, 剧烈振荡 20 s, 静止 2 min。于 4 $^{\circ}$ C、12 000 \times g 离心 15 min, 吸取上层水相转移到新的 1.5 mL 的离心管中, 加入等体积异丙醇, 室温沉淀 30 min。12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 70% 乙醇洗涤沉淀 1 次, 晾干, 用无 RNase 的 ddH₂O 溶解 RNA, 测定浓度。

取 10 μ g 总 RNA, 用 DNase I (Promega) 处理 30 min 以消化基因组 DNA, 70 $^{\circ}$ C 灭活 DNase I。取消化过的 2 μ g 总 RNA, 加入 0.5 μ g 随机引物, 补水至 10 μ L, 于 70 $^{\circ}$ C 加热 5 min, 立刻置冰上冷却。随后加入反转录体系的其他试剂 (5 \times 反转录缓冲液、dNTPs、RNase 抑制剂 (TaKaRa) 及反转录酶 M-MLV (Promega))。反转录在 37 $^{\circ}$ C 进行 1 h, 然后于 70 $^{\circ}$ C 灭活反转录酶。产物用 Real-time PCR Master Mix (TOYOBO) 进行实时荧光定量分析。引物序列见表 1。

1.5 Western blotting 分析

将收获的 24 孔板的细胞, 每孔用 40 μ L 1 \times SDS 加样缓冲液裂解, 裂解液转移到 1.5 mL 的离心管中。裂解液样品用沸水煮 10 min, 随后高速离心 10 min。样品电泳后, 转印到 PVDF 膜, 用 BSA 封闭膜。PDIP38 的兔源多克隆抗体由瑞典卡罗林斯卡医学院细胞与分子生物学系的 Mario M. Müller 教授惠赠。辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗购自北京天根生物工程公司。化学发光试剂为 West Pico 化学发光底物试剂盒 (北京天根)。

1.6 统计分析

所有数据以均数 \pm 标准误表示 ($\bar{x}\pm s$)。使用 Excel 软件进行 *T* 检验以比较样本间差异。 $P < 0.05$ 视为有统计学差异。

2 结果

2.1 对 PDIP38 mRNA 上的 miRNA 结合位点进行生物信息学分析

鉴于 PDIP38 在小鼠胚胎干细胞 R1 以及其形成类胚体以后的表达变化,我们认为 miRNA 在胚胎干细胞分化过程中对 PDIP38 蛋白表达有重要的调节作用。为了验证我们的假设,利用 microInspector 软件对 PDIP38 基因能够结合的 miRNA 进行了预测分析。由于已有报道 miRNA 的靶位点除了位于 3' UTR 外,也可以位于靶基因的编码框^[18-19],所以我们的预测也同时针对靶基因的编码框和非翻译区序列。如图 1 所示,miR-291a-5p 和 PDIP38 的编码框接近 3' 末端的一段区域有着高度的互补性,在 miR-291a-5p 的 1~11 位碱基区域(种子区域为 2~8 位碱基)更是完全配对。该靶位点的配对性相当稳定,自由能为-39.7 kcal/mol。并且在不同种属中,PDIP38 的该区域附近都有这一个保守的靶位点序列。这说明,PDIP38 很有可能是 miR-291a-5p 的一个靶基因。

2.2 荧光素酶报告基因分析 miR-291a-5p 对 PDIP38 的调节

为了验证 PDIP38 是否确实能被 miR-291a-5p 调控,我们构建了 2 个报告基因载体,一个包含这一靶位点,一个则不包含,如图 2A 所示。将这 2 个报告质粒及化学合成的 miR-291a-5p 共转染 293T 细胞,发现带有这一靶位点的报告基因受到明显的抑制。而在加入了 miR-291a-5p 的反义寡核苷酸后,报告基因的抑制受到明显的解除,如图 2B 所示。这说明 miR-291a-5p 可以与 PDIP38 上的这一靶位点结合进而抑制其蛋白表达。

2.3 Western blotting 验证 miR-291a-5p 可以在蛋白水平调节 PDIP38 的表达

为了进一步证实,我们将 Flag 融合的 PDIP38 的完整 ORF 和 miRNA 或反义核酸共转染入 293T 细胞。观察当靶位点位于 ORF 区域时,miR-291a-5p 对 PDIP38 的调控是否仍然有效。如图 3 所示,当靶位点位于 ORF 区域时,miR-291a-5p 仍然能够明显下调 PDIP38 的表达。这种抑制可被 miR-291a-5p 的反义核酸特异地逆转,使 PDIP38 的表达得以恢复。

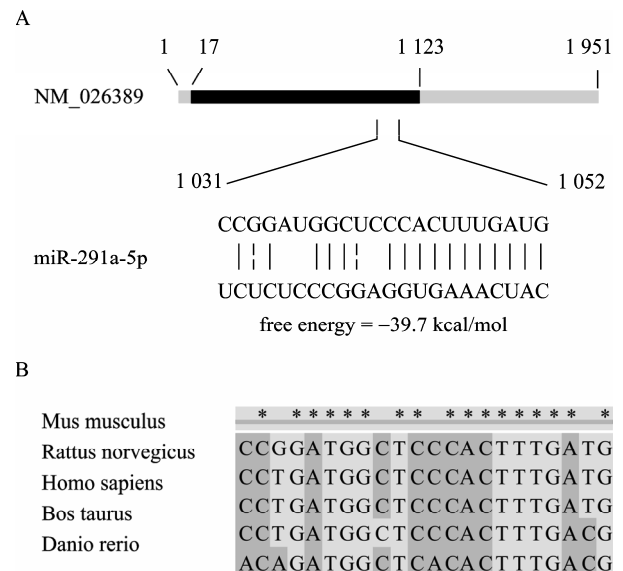


图 1 预测 PDIP38 mRNA 上 miR-291a-5p 的靶位点

Fig. 1 Predicted target site of miR-291a-5p on PDIP38 mRNA. (A) The base pairing between miR-291a-5p and its target site on PDIP38 mRNA. (B) The conservation of the miR-291a-5p target site.

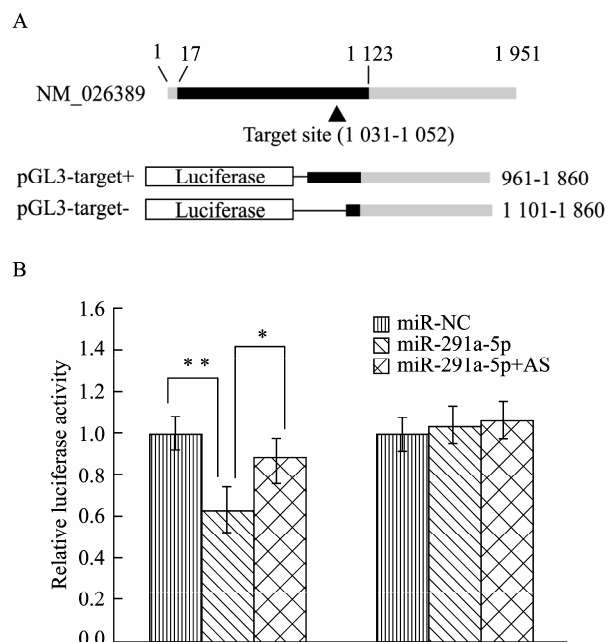


图 2 荧光素酶报告基因分析 miR-291a-5p 对 PDIP38 的调节 (统计数据为 3 次独立实验的结果,每次实验重复 1 次, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

Fig. 2 Identification of miR-291a-5p regulating the expression of PDIP38 by luciferase reporter assay. (A) The schematic diagram of the reporter plasmids with or without target site. (B) The regulation of miR-291a-5p on the target site of PDIP38 mRNA analyzed by luciferase assay. miR-NC: negative control; AS: miRNA inhibitor (antisense). Data shown were $\bar{x} \pm s$ values from three independent experiments performed in duplicate (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

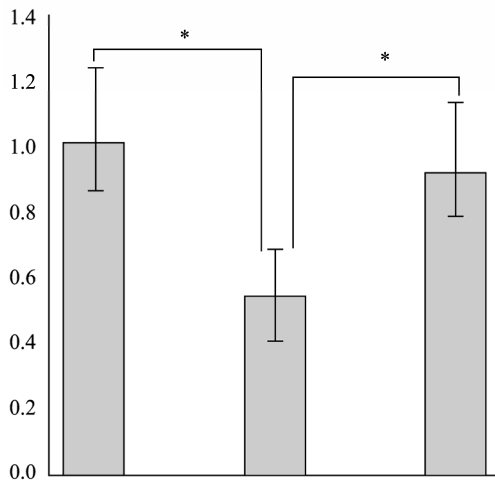
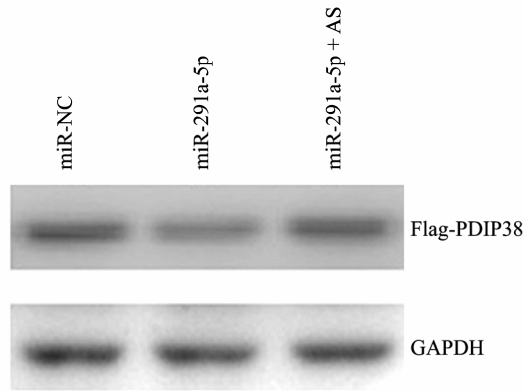


图3 miR-291a-5p 抑制外源的 Flag 标记的 PDIP38 的表达 (统计数据为 3 次独立实验的结果, * $P < 0.05$)

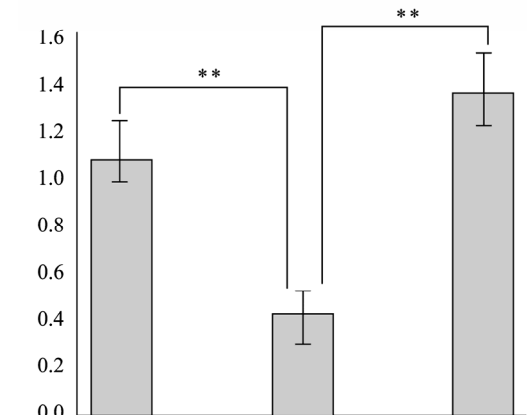
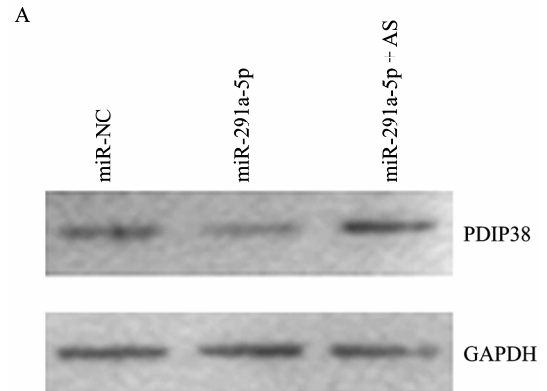
Fig. 3 miR-291a-5p inhibited the expression of exogenous Flag tagged PDIP38. Data shown were $\bar{x} \pm s$ values from three independent experiments (* $P < 0.05$).

2.4 在胚胎干细胞 R1 中证实 miR-291a-5p 可以调节内源性 PDIP38 蛋白的表达

最后, 我们检测了胚胎干细胞系 R1 内源的 PDIP38 表达是否也受 miR-291a-5p 调节。图 4A 表明在转染了 miR-291a-5p 以后, 内源的 PDIP38 明显下调。而用反义核酸抑制了 miR-291a-5p 以后, PDIP38 的表达也显著回升。同时, PDIP38 的 mRNA 则没有明显变化 (图 4B)。这说明 miR-291a-5p 是在转录后水平上抑制 PDIP38 的表达。

3 讨论

miRNA 是近年发现的一类新的非编码调节性小 RNA。研究发现 miRNA 广泛参与了生物体的各种生理过程。miR-291a-5p 是在胚胎干细胞中特异表达的 miRNA 基因簇中的一个成员。高度的表达特异



B

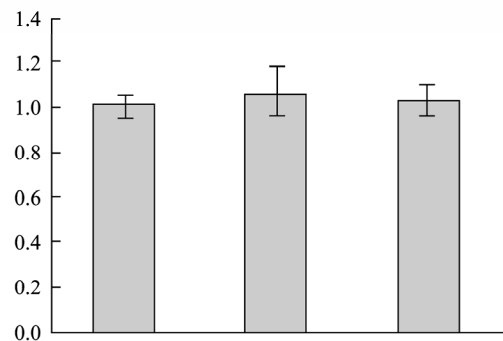


图4 miRNA 基因簇抑制内源 PDIP38 蛋白的表达差异

Fig. 4 The differentiation of inhibited the protein expression of endogenous PDIP38 by miRNA. (A) miR-291a-5p inhibited the protein expression of endogenous PDIP38. (B) miR-291a-5p did not inhibit the mRNA of PDIP38. Data shown were $\bar{x} \pm s$ values from three independent experiments (** $P < 0.01$).

性表明这些 miRNA 可能在维持胚胎干细胞和神经干细胞的低分化状态中发挥一定的作用。但是, 目前为止这些 miRNA 的具体功能尚未得到证实。

miR-291a 是从小鼠的胚胎干细胞中克隆到的一个 miRNA 基因簇成员, 该 miRNA 基因簇约在 2.2 kb 以内, 包含 7 个 miRNA 发夹结构——miR-290、miR-291a、miR-291b、miR-292、miR-293、miR-294

和 miR-295^[10,16]。目前在大鼠中只发现有 miR-290、miR-291a 和 miR-292，也是成簇分布的^[15]。尚未在人类中发现这一 miRNA 簇的同源物。研究发现，此基因簇是胚胎干细胞和神经干细胞中特有的 miRNA^[16]。其中 miR-291a-3p、miR-291b-3p、miR-294、miR-295 可促进因细胞周期的进程（从 G1 期转变到 S 期），可能进而因此介导了干细胞的增殖^[16,20]。最近的研究揭示 miR-291-3p、miR-294、miR-295 可以提高 Oct4、Sox2、Klf4 诱导的细胞重编程效率^[20]。此外，人们对这一基因簇上的 miRNA 的功能还知之甚少。

PDIP38 的功能目前还了解不多，已有的研究结果证明 PDIP38 可以和 PCNA 结合^[11]，而 PCNA 在 DNA 复制过程中可以募集 DNA 聚合酶 δ 到 DNA 上，通过修复损伤的 DNA 来提高前导链的合成效率^[12]。此外，PDIP38 在整个有丝分裂的过程中都定位于有丝分裂的纺锤体^[13-14]。2009 年 Lyle 等^[15]的研究则证明 PDIP38 可能是动脉粥样硬化和血管狭窄等血管疾病的新的治疗靶点，而这些功能都是通过影响血管平滑肌细胞中的活性氧水平以及动态细胞骨架重塑来实现的。

我们的前期研究结果发现 PDIP38 在小鼠胚胎干细胞 R1 中有表达，在 R1 形成类胚体分化以后其蛋白表达显著升高，而其 mRNA 表达则无明显变化，这使我们想到了 miRNA 可能在此分化过程中发挥重要作用。为了深入了解 PDIP38 在胚胎干细胞分化中的功能以及是否通过 miRNA 调节其蛋白表达，我们通过生物信息学方法预测到了胚胎干细胞中高表达的 miRNA——miR-291a-5p 可能调节其表达，并首先在 293T 细胞中通过荧光素酶报告基因以及 Western blotting 等方法证实了其能够显著抑制 PDIP38 蛋白的表达水平，而转染 miR-291a-5p 的反义核酸则能够逆转这种抑制作用。为了进一步确认此抑制作用，我们将 miR-291a-5p 转染入胚胎干细胞 R1 中，同样证实了其对 PDIP38 蛋白表达的抑制作用。采用多种实验方法，针对内源表达和外源表达的 PDIP38 以及从过表达 miRNA 和抑制 miRNA 表达等多个角度的论证使我们更加明确了 miR-291a-5p 对 PDIP38 的抑制作用。我们推测，PDIP38 和

PCNA、DNA 聚合酶 δ 以及纺锤体蛋白结合以后将发挥负调控 DNA 合成、细胞分裂和细胞周期的作用。而在增殖旺盛的干细胞内，miR-291a-5p 可能通过负调节 PDIP38 促进了 DNA 的复制、细胞分裂，进而维持了干细胞的高增殖能力。

综上所述，我们从多个角度证明了 PDIP38 是 miR-291a-5p 的一个靶基因。这是到目前为止国际上鉴定的第一个 miR-291a-5p 的靶基因。这一信息对于进一步了解 PDIP38 以及 miR-291a-5p 在胚胎干细胞分化以及细胞分裂和迁移中的功能提供了重要的线索。

REFERENCES

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, **116**: 281–297.
- [2] Brodersen P, Voinnet O. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, **10**: 141–148.
- [3] Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, **23**: 175–205.
- [4] Williams AE. Functional aspects of animal microRNAs. *Cell Mol Life Sci*, 2008, **65**: 545–562.
- [5] Schickel R, Boyerinas B, Park SM, *et al.* MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene*, 2008, **27**: 5959–5974.
- [6] Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell*, 2006, **11**: 441–450.
- [7] Wienholds E, Plasterk RH. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett*, 2005, **579**: 5911–5922.
- [8] Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, *et al.* A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 2007, **129**: 1401–1414.
- [9] Laurent LC. MicroRNAs in embryonic stem cells and early embryonic development. *J Cell Mol Med*, 2008, **12**: 2181–2188.
- [10] Gangaraju VK, Lin H. MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, **10**: 116–125.
- [11] Liu L, Rodriguez-Belmonte EM, Mazloun N, *et al.* Identification of a novel protein, PDIP38, that interacts with the p50 subunit of DNA polymerase delta and proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 10041–10047.
- [12] Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro

- of the replication fork. *Cell*, 2007, **129**: 665–679.
- [13] Cheng X, Kanki T, Fukuoh A, *et al.* PDIP38 associates with proteins constituting the mitochondrial DNA nucleoid. *J Biochem*, 2005, **138**: 673–678.
- [14] Klaile E, Kukalev A, Obrink B, *et al.* PDIP38 is a novel mitotic spindle-associated protein that affects spindle organization and chromosome segregation. *Cell Cycle*, 2008, **7**: 3180–3186.
- [15] Lyle AN, Deshpande NN, Taniyama Y, *et al.* Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 2009, **105**: 249–259.
- [16] Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell*, 2003, **5**: 351–358.
- [17] Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, *et al.* Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet*, 2008, **40**: 1478–1483.
- [18] Duursma AM, Kedde M, Schrier M, *et al.* miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA*, 2008, **14**: 872–877.
- [19] Tay Y, Zhang J, Thomson AM, *et al.* MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 2008, **455**: 1124–1128.
- [20] Judson RL, Babiarz JE, Venere M, *et al.* Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol*, 2009, **27**: 459–461.