

ФЕШИНА М.О., КУЧЕРЕНКО З.Г., КОВАЛЕВСЬКА Л.М., КАШУБА О.В.✉

Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 45, ORCID: 0000-0002-7550-9392, 0000-0001-7001-4035

✉ Kashuba@nas.gov.ua, lenakash@yahoo.com, (044) 259-01-83, (098) 237-83-27

ВИВЧЕННЯ УБІКВІТИНУВАННЯ БІЛКІВ РОДИНИ MRPS18 *IN VITRO*

Мета. Відомо, що в клітинах пухлин дитячого віку патологічні зміни часто включають інактивацію клітинних шляхів, зокрема таких, як TP53 та RB-E2F1. Одним із протеїнів, який контролює клітинний шлях RB-E2F1, є MRPS18-2, що належить до родини мітохондрійних рибосомних протеїнів MRPS18. Важливо вивчити стабільність білків цієї родини та здатність їх до убіквітинування, що сприятиме вивченню функціональних властивостей цих білків та їх роль у трансформації клітини. **Методи.** Отримання кДНК у векторі FLAG для експресії злитих білків, трансфекція пухлинних клітин людини MCF7, вивчення клітинної локалізації білків родини MRPS18 та їх убіквітинування за допомогою флуоресцентної мікроскопії з використанням специфічних антитіл. **Результати.** Було виявлено, що злиті протеїни FLAG-MRPS18-1 і FLAG-MRPS18-3 частково колокалізуються із злитим протеїном HA-Ub у цитоплазмі у клітинах лінії MCF7. Протеїн FLAG-MRPS18-2 локалізується у ядрі. **Висновки.** Ядерна локалізація білка FLAG-MRPS18-2 може свідчити про його додаткові функції у клітині: за рахунок взаємодії з протеїном RB і позитивного впливу на моно-убіквітування гістону H2B протеїн MRPS18-2, можливо, задіяний у регуляції структури хроматину.

Ключові слова: мітохондрійні рибосомні протеїни, MRPS18, деградація протеїнів, протеасоми, убіквітинування.

Родина мітохондріальних рибосомних протеїнів MRPS18 включає три білки – MRPS18-1 (MRPS18C), MRPS18-2 (MRPS18B) і MRPS18-3 (MRPS18A). Геномами багатоклітинних тварин (metazoan) кодуються всі три гомологи, а в інших організмах тільки один гомолог [1]. Протеїни родини MRPS18 кодуються ядерним геномом, у людини гени знаходяться на різних хромосомах: MRPS18-2 і MRPS18-3 знаходяться на шостій хромосомі, а MRPS18-1 – на четвертій. Протеїни також розташовані на різних ділянках

міторибосоми. Так, MRPS18-1 та MRPS18-2 знаходяться на малій субодиниці, у той час як MRPS18-3 – на великій [2; 3]. Нами було встановлено, що предком усіх трьох гомологів був бактеріальний протеїн MRPS18, а під час еволюційного розвитку пройшла дуплікація первинного гена, причому у тварин (metazoan) дуплікація відбулася тричі. На сьогодні існує три різних, але гомологічних один одному білки, причому один із них є транслокованим на іншу хромосому (ген MRPS18-1 транслоковано з шостої хромосоми на четверту). Важливо також зазначити, що ген MRPS18-3 є результатом більш давньої дуплікації, що пояснює розташування білків родини MRPS18 на різних субодиницях міторибосоми [4].

Серед усіх гомологів родини MRPS18 протеїн MRPS18-2 є найбільш дослідженим. Так, рівень експресії білка MRPS18-2 підвищено у багатьох формах онкологічних захворювань, зокрема таких, як рак ендометрію [5], передміхурова залоза [6], гепатоклітинна карцинома [7], інвазивна карцинома молочної залози [8], В-клітинні лімфоми [9] і гліобластоми [10]. Більше того, протеїн MRPS18-2 є онкопротеїном, він бере безпосередню участь у регуляції клітинного циклу за рахунок взаємодії із білком ретинобластоми (RB), що інгібує перехід G₁-S [11; 12].

Незважаючи на те, що протеїн MRPS18-2 є найбільш вивченим серед вищевказаної родини, немає інформації щодо його стабільності, убіквітинування та швидкості деградації, що гальмує розуміння функції цього білка та всіх протеїнів родини MRPS. Тому метою нашої роботи було вивчення стабільності білків окресленої родини та здатність їх до убіквітинування, що сприятиме визначенню функціональних властивостей таких білків та їх роль у трансформації клітини.

© ФЕШИНА М.О., КУЧЕРЕНКО З.Г., КОВАЛЕВСЬКА Л.М., КАШУБА О.В.

Матеріали і методи**Отримання плазмід**

Для клонування кДНК генів родини MRPS18 використовували специфічні праймери, що містили сайти рестрикції HindIII та XbaI, і оригінальні клони, одержані із компанії Origene (США). Як вектор використовували плазмиду рFLAG-CMV, у якій послідовність, кодуєча FLAG, знаходиться на 3'-кінці. В роботі використовували набори PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit та GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific, США). Ефективність клонування доводили прямим секвенуванням отриманих рекомбінантних конструктів. Плазміда, кодуєча злитий протеїн HA-Ub, була отримана в подарунок від професора А. Чіканова (Техніон, Хайфа, Ізраїль).

Трансфекції та лінія клітин

Клітинна лінія, отримана із інвазивної карциноми протоків молочної залози, MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) була взята в банку ліній клітин при ІЕПОР ім. Р.С. Кавецького НАН України. Клітини культивували за температури 37°C в атмосфері 5% CO₂. Клітини нащували в 6-лункових планшетах на покривних скельцях у модифікованому середовищі Іскова (IMDM, ThermoFisher Scientific) з додаванням 10% сироватки бика та антибіотиків. Трансфекцію клітин у логарифмічній фазі росту проводили за допомогою ліпофектину та Реагенту Плюс (Life Technologies, США), використовуючи плазмиди FLAG-MRPS18(1-3) і HA-Ub, а також відповідний вектор FLAG у якості негативного контролю. Через 48 год після трансфекції аналізували трансфіковані клітини.

Імунофарбування та флуоресцентна мікроскопія

Клітини фіксували в суміші метанолу і ацетону (1:1) за температури -20°C протягом не менше 20 хв. Після регідратації у фосфатному буфері (PBS) на клітини наносили первинні антитіла (кролячі анти-FLAG, 1:100 у буфері, який містив альбумін із сироватки бика і тритон X-100) та інкубували впродовж 1 год за кімнатної температури, після чого тричі відмивали PBS. Всі первинні антитіла були від фірми Cell signaling, США, а вторинні – DAKO, Данія. Далі наносили вторинні анти-кролячі антитіла, продуковані у свині і кон'юговані із FITC (1:30), протягом 30 хв за кімнатної температури і та-

кож тричі відмивали PBS. Потім наносили мишачі моноклональні антитіла проти гемаглютиніну вірусу грипу (HA) (1:50) на 1 год. Після відмивки PBS наносили анти-мишачі вторинні антитіла, продуковані у коня і кон'юговані із TR (1:200). До останніх антитіл додавали Hoechst (біс-бензimid 3223) (Invitrogen, США) в концентрації 0,5 мкг/мл. Усі реакції здійснювали у вологій камері. Потім на препарати наносили 80% розчин гліцерину у PBS, який містив 2,5% 1,4-діаза-біцикло-(2.2.2)-октану (Sigma, США) і накривали покривними скельцями.

Імунофлуоресценцію реєстрували за допомогою флуоресцентного мікроскопа фірми Zeiss (Німеччина) і цифрової камери CD4400 (Hamamatsu, Японія). Одержані графічні файли зберігали у форматі TIFF (24 біти).

Результати та обговорення

Для вивчення убівітинування протеїнів *in vitro* кДНК, які кодуєть протеїни родини MRPS18, було проклоновано у плазмідний вектор з тагом FLAG для трансфекції у клітини ссавців (рFLAG-CMV). Далі отриманими плазмідами трансфікували клітини лінії MCF7 разом із плазмидою HA-Ub. Ко-трансфекцію із пустим вектором рFLAG-CMV використовували в якості негативного контролю.

Після трансфекції клітини фіксували через 48 годин і проводили подвійне фарбування за допомогою кролячих анти-FLAG та мишачого анти-HA антитіл. У якості вторинних використовували антитіла із флуоресцентними мітками: проти кролячих – продуковані у свині і мічених FITC, проти мишачих – продуковані у коня та кон'югованих із міткою TR (Texas Red).

Контрольні трансфекції показали, що сигнали FLAG і HA не є високими; частково вони перекриваються у цитоплазмі клітин (рис. 1).

Після трансфекції клітин конструктами, кодуєчими злиті протеїни FLAG-MRPS18-1 і HA, спостерігали обидва протеїни в цитоплазмі трансфікованих клітин (рис. 2). Як видно з рисунка, спостерігається перекривання сигналів FLAG-MRPS18-1 (зелений колір) і HA-Ub (червоний колір), в основному в цитоплазмі. Раніше нами було встановлено, що протеїн MRPS18-1 швидко руйнується – період напіврозкладу складає від 3 до 5 хвилин.

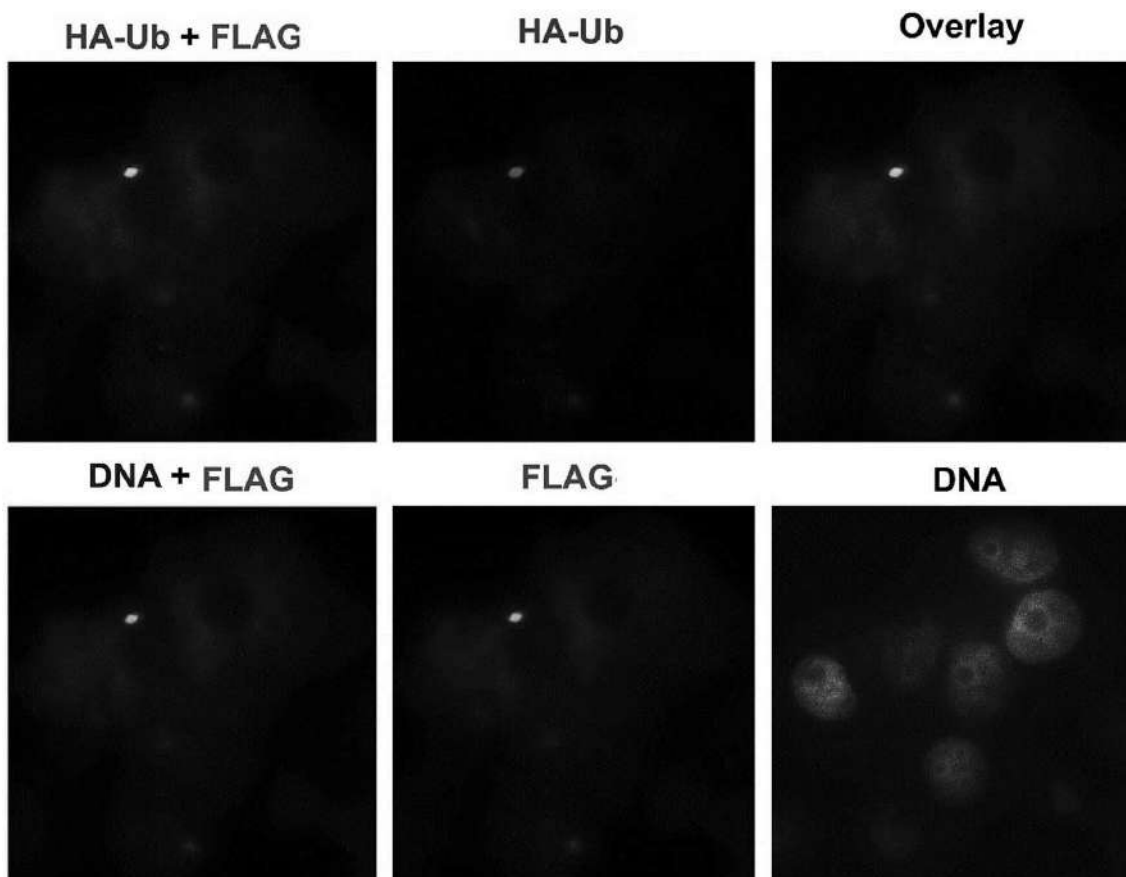


Рис. 1. Ко-трансфекція клітин MCF7 плазмідами, кодуєчими поліпептиди FLAG і HA-Ub. Сигнали FLAG (зелений) і HA (червоний) низької інтенсивності, проте частково перекриваються (верхня ліва панель).

Протеїну MRPS18-3 властивий період напіврозкладу 40–50 хвилин. У трансфікованих клітинах злитий протеїн FLAG-MRPS18-3 також демонструє цитоплазматичну локалізацію, причому майже весь сигнал цього білка перекривається із цитоплазматичним сигналом злитого протеїну HA-Ub (рис. 3). Цей факт дає підставу стверджувати, що деградація протеїну MRPS18-3 може проходити за рахунок убіквітування і деградації полі-убіквітованого протеїну на протеасомах.

Несподівано найбільш стабільний протеїн – MRPS18-2, час напіврозкладу якого перевищує 4 години, показує зовсім іншу картину (рис. 4).

На відміну від інших протеїнів родини MRPS18, сигнал злитого білка FLAG-MRPS18-2 детектується в ядрі клітин MCF7 (рис. 4, помічено стрілками). Це може бути пов'язано з його високою стабільністю. Цікаво, що сигнал злитого білка HA-Ub спостерігався не тільки в цитоплазмі, а і у ядрі. Це стосується трансфікованих

клітин, які отримали обидві плазміди. Тоді сигнали двох вказаних протеїнів ко-локалізувалися у ядрі клітин.

Раніше нами було з'ясовано, що фактор транскрипції KLF4 зв'язується із промоторною ділянкою гена *MRPS18-2* та активує транскрипцію останнього [13]. Протеїн KLF4 індукує плюрипотентність клітин, а також бере участь у розвитку злоякісних новоутворень різного генезу, що частково пояснює високий рівень експресії протеїну MRPS18-2 у стовбурових і пухлинних клітинах. Більше того, нами було встановлено, що протеїн MRPS18-2 за рахунок взаємодії з білком RB підсилює моно-убіквітування гістону H2B [13], який контролює експресію генів, задіяних у підтриманні фенотипу стовбурових клітин.

Гіпотетично протеїн MRPS18-2 може брати участь у регуляції структури хроматину, що планується довести експериментально у майбутньому.

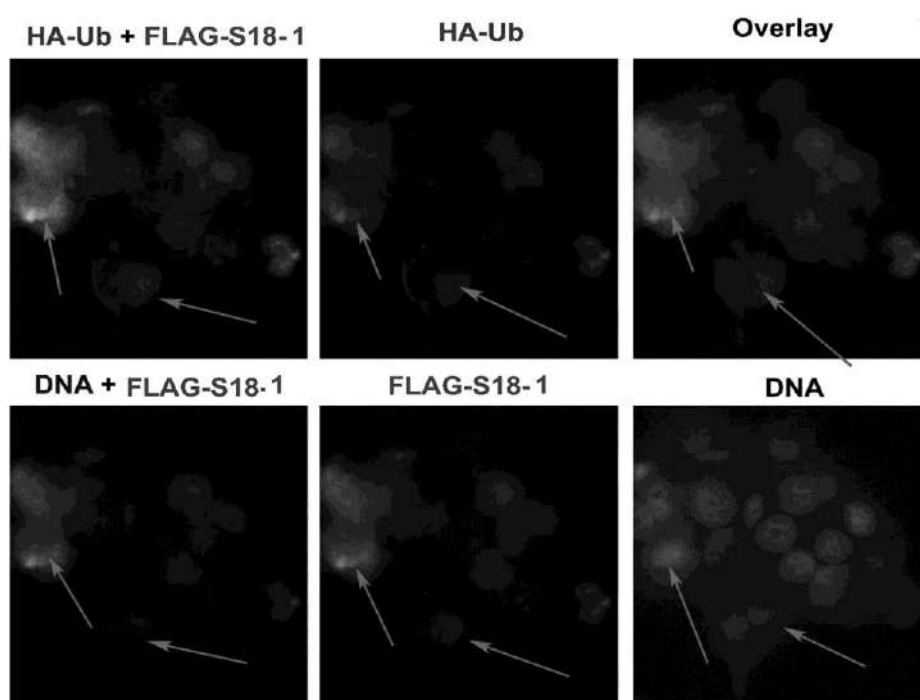


Рис. 2. Ко-трансфекція клітин MCF7 плазмідами, кодуєчими злиті протеїни FLAG-MRPS18-1 і HA-Ub. Сигнали FLAG-MRPS18-1 (зелений) і HA-Ub (червоний) перекриваються в цитоплазмі трансфікованих клітин (помічено стрілками), що може свідчити про масивне убіквітування протеїну MRPS18-1.

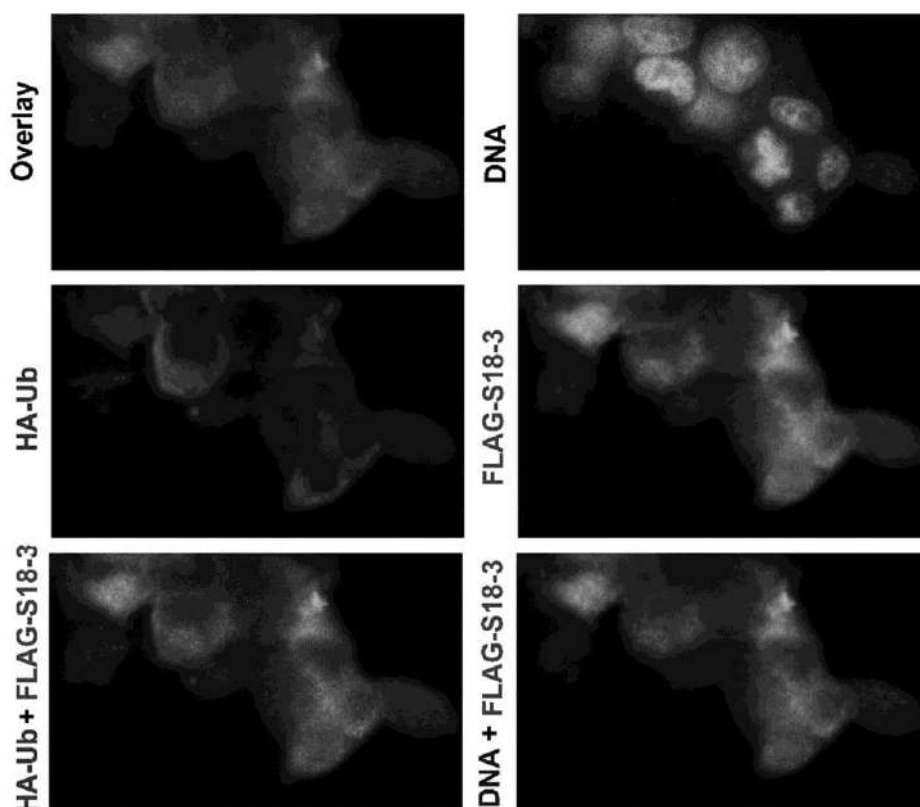


Рис. 3. Ко-трансфекція клітин MCF7 плазмідами, кодуєчими злиті протеїни FLAG-MRPS18-3 і HA-Ub. Сигнали FLAG-MRPS18-3 (зелений) і HA-Ub (червоний) перекриваються в цитоплазмі трансфікованих клітин (помічено стрілками), що може свідчити про масивне убіквітування протеїну MRPS18-3.

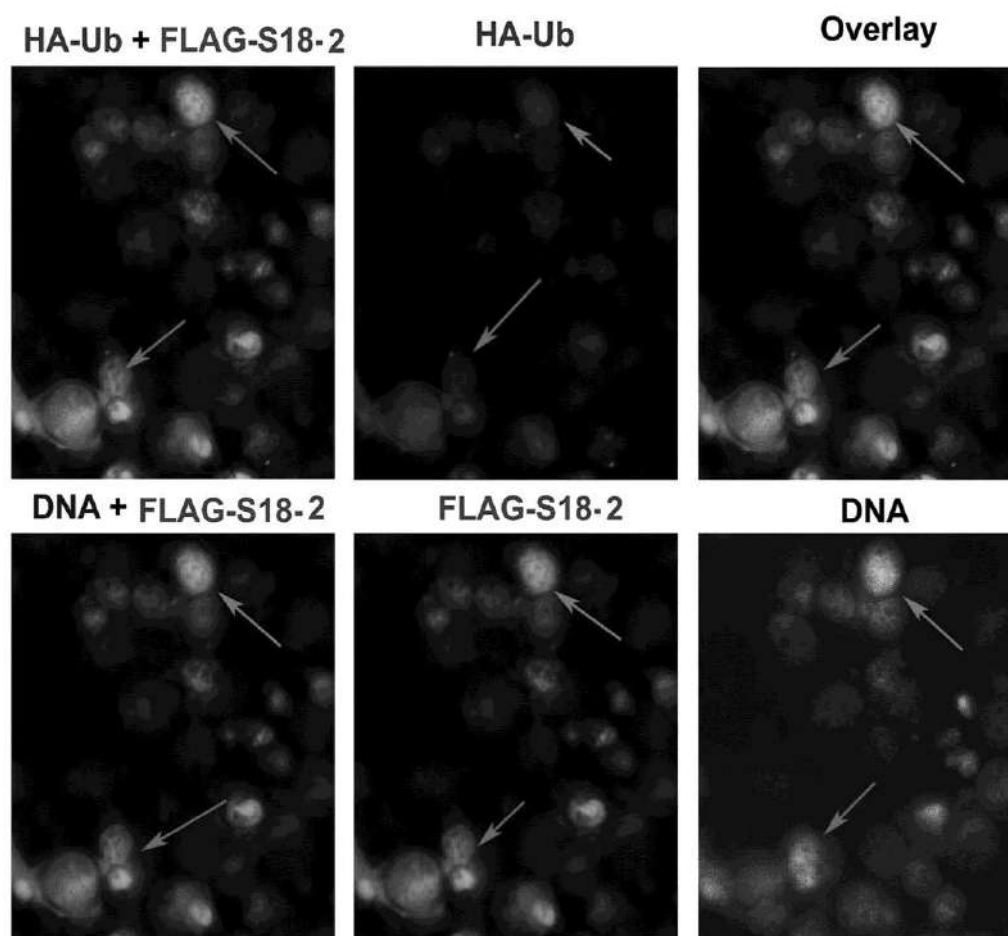


Рис. 4. Патерн експресії злитих протеїнів FLAG-MRPS18-2 і HA-Ub у клітинах MCF7. Сигнали FLAG-MRPS18-2 (зелений) і HA-Ub (червоний) перекриваються в основному у ядрі трансфікованих клітин (помічено стрілками).

Висновки

Отже, отримані експериментальні дані свідчать про те, що гомологи родини MRPS18 мають різні біохімічні властивості та функції. Так, протеїни MRPS18-1 і MRPS18-3, злиті із тагом FLAG, показують локалізацію у цитоплазмі трансфікованих клітин MCF7, причому їх сигнал перекривається із сигналом злитого білка HA-Ub, який знаходиться в цитоплазмі. Найбільш стабільний протеїн родини мітохондрій-

них рибосомних білків MRPS18–MRPS18-2 – локалізується в основному у ядрі, у випадку ко-експресії із злитим протеїном HA-Ub, що вказує на його характерну і важливу функцію в клітині. Гіпотетично протеїн MRPS18-2 може брати участь у регуляції структури хроматину, що планується довести експериментально у майбутніх роботах.

Пропоновану роботу було підтримано Національною академією наук України (грант № 0119U103905).

References

1. Penzo M., Montanaro L., Trere D., Derenzini M. The Ribosome Biogenesis—Cancer Connection. *Cells*. 2019. Vol. 8. P. 55. doi: 10.3390/cells8010055.
2. Greber B.J., Ban N. Structure and function of the mitochondrial ribosome. *Annu. Rev. Biochem.* 2016. Vol. 85. P. 103–132.
3. Greber B.J., Boehringer D., Leibundgut M., Bieri P., Leitner A., Schmitz N., Aebersold R., Ban N. The complete structure of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Nature*. 2014. Vol. 515. P. 283–286. doi: 10.1038/nature13895.
4. Mushtaq M., Ali R.H., Kashuba V., Klein G., Kashuba E. S18 family of mitochondrial ribosomal proteins: evolutionary history and Gly132 polymorphism in colon carcinoma. *Oncotarget*. 2016. Vol. 7. P. 55649–55662.
5. Mints M., Mushtaq M., Iurchenko N., Kovalevska L., Stip M.C., Budnikova D., Andersson S., Polischuk L., Buchynska L., Kashuba E. Mitochondrial ribosomal protein S18-2 is highly expressed in endometrial cancers along with free E2F1. *Oncotarget*. 2016. Vol. 7. P. 22150–22158. doi: 10.18632/oncotarget.7905.

6. Mushtaq M., Jensen L., Davidsson S., Grygoruk O.V., Andren O., Kashuba V., Kashuba E. The MRPS18-2 protein levels correlate with prostate tumor progression and it induces CXCR4-dependent migration of cancer cells. *Sci Rep*. 2018. Vol. 8. P. 2268. doi: 10.1038/s41598-018-20765-8.
7. Buivydiene A., Liakina V., Valantinas J., Norkuniene J., Mockiene E., Jokubauskiene S., Smaliukiene R., Jancoriene L., Kovalevska L., Kashuba E. Expression levels of the uridine-cytidine kinase like-1 protein as a novel prognostic factor for Hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinomas. *Acta Naturae*. 2017. Vol. 9. P. 108–114.
8. Buchynska L.G., Iurchenko N.P., Kashuba E.V., Brieieva O.V., Glushchenko N.M., Mints M., Lukianova N.Y., Chekhun V.F. Overexpression of the mitochondrial ribosomal protein S18-2 in the invasive breast carcinomas. *Exp Oncol*. 2018. Vol. 40. P. 303–308.
9. Kovalevska L., Kashuba E. Expression pattern of MRPS18 family genes in malignantly transformed b-cells. *Exp oncol*. 2020. Vol. 42. P. 295–299.
10. Kovalevska L.M., Malysheva T.A., Kalman S.S., Rozumenko A.V., Verbova L.V., Rozumenko V.D., Kashuba E.V. Expression pattern of MRPS18 family genes in gliomas. *Exp Oncol*. 2021. Vol. 43. P. 204–208. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no-3.16461.
11. Kashuba E., Yurchenko M., Yenamandra S.P., Snopok B., Isaguliants M., Szekely L., Klein G. EBV-encoded EBNA-6 binds and targets MRS18–2 to the nucleus, resulting in the disruption of pRb-E2F1 complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008. Vol. 105. P. 5489–5494.
12. Mushtaq M., Gaza H.V., Kashuba E.V. Role of the RB-Interacting Proteins in Stem Cell Biology. *Adv Cancer Res*. 2016. Vol. 131. P. 133–157.
13. Mushtaq M., Kovalevska L., Darekar S., Abramsson A., Zetterberg H., Kashuba V., Klein G., Arsenian-Henriksson M., Kashuba E. Cell stemness is maintained upon concurrent expression of RB and the mitochondrial ribosomal protein S18-2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020. Vol. 117. P. 15673–15683. doi: 10.1073/pnas.1922535117.

FESHINA M.O., KUCHERENKO Z.G., KOVALEVSKA L.M., KASHUBA O.V.

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 45

STUDY ON UBIQUITINATION OF PROTEINS OF THE MRPS18 FAMILY *IN VITRO*

Aim. It is known that in cancerous cells of childhood tumors the pathological changes often include inactivation of the TP53 and RB-E2F1 cellular pathways. One of the proteins controlling the latter pathway is MRPS18-2, that belongs to a family of mitochondrial ribosomal proteins MRPS18. It is important, to study the stability of proteins of this family and their ubiquitination, that might help to conclude about the functional properties of these proteins and their role in cell transformation. **Methods.** Cloning of cDNA in FLAG vector for expression of fusion proteins, transfection of human tumor cells MCF7, study on cellular localization of MRPS18 family proteins and their ubiquitination by fluorescence microscopy, using specific antibodies. **Results.** The FLAG-MRPS18-1 and FLAG-MRPS18-3 fusion proteins are partially co-localizing with the HA-Ub fusion protein in the cytoplasm of MCF7 cells. The FLAG-MRPS18-2 protein is localized also in the nucleus. **Conclusions.** Nuclear localization of the FLAG-MRPS18-2 protein may indicate its additional functions in the cell: due to the interaction with the RB protein and the positive effect on mono-ubiquitination of histone H2B, the MRPS18-2 protein may be involved in the regulation of chromatin structure. **Keywords:** mitochondrial ribosomal proteins, MRPS18, protein degradation, proteasomes, ubiquitination.