

Л.М. Ковалевська
О.В. Кащуба

Інститут експериментальної
патології, онкології
та радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ, Україна

ФУНКЦІОНАЛЬНІ НАСЛІДКИ ВЗАЄМОДІЇ ПРОТЕЇНІВ MRPS18-2 ТА RB ПРИ ТРАНСФОРМАЦІЇ КЛІТИНИ

Ключові слова:

мітохондріальний
рибосомальний протеїн, протеїн
MRPS18-2, іморталізація
клітини, трансформація
клітини, злоякісні
новоутворення, стовбурові
клітини, білок RB.

Стаття присвячена аналізу даних наукової літератури та висвітленню власних результатів щодо раніше невідомих функцій мітохондріального рибосомального білка S18-2, який кодовано ядерним геном. Описана кооперація білків RB і S18-2 у підтриманні фенотипу стовбурових клітин, і порушення балансу їх експресії призводить до виникнення пухлин. Також проаналізовано функціональні наслідки взаємодії протеїнів RB і S18-2 в контролі за стовбуровістю клітин та їх диференціюванням. Представлено дані стосовно того, що білок S18-2 є потужним онкопротеїном. Зроблено припущення, що зниження рівнів протеїну S18-2 може бути потенційно успішною стратегією для лікування пацієнтів зі злоякісними пухлинами.

Роль гена *RB1* у виникненні злоякісних новоутворень. Відомо, що ретинобластома, одна з пухлин сітківки ока, діагностується у дітей віком до 2 років, особливо у разі спадкового захворювання. Специфічне вікове вікно виникнення ретинобластоми свідчить про те, що утворення пухлини залежить від проліферації клітин, які лише тимчасово наявні в сітківці [1]. Наразі встановлено, що основним генетичним фоном для виникнення ретинобластоми є інактивація гена *RB1* (retinoblastoma susceptibility gene), який кодує білок RB, головним чином, за рахунок його повної або часткової делеції [2]. Ген *RB1* є першим геном-супресором пухлинного росту, який було клоновано, і делеція цього гена пов'язана з розвитком певного злоякісного новоутворення, а саме — ретинобластоми [3, 4]. Функціональні наслідки інактивації гена *RB1* є першим експериментальним підтвердженням мутаційної гіпотези (two-hits hypothesis) розвитку злоякісних пухлин, запропонованої Альфредом Кнудсоном (Alfred Knudson), яка пояснює відмінності у виникненні спорадичної та спадкової форми новоутворень [5]. Для виникнення злоякісної пухлини необхідною умовою є інактивація важливого гена на обох алелях; найчастіше це відбувається за рахунок мутацій, часто саме делецій. Так, якщо мутація в одному з алелей успадкована, то для виникнення другої мутації потрібно менше часу, у порівнянні зі спорадичним виникненням мутацій в обох алелях. І дійсно, спадкова форма ретинобластоми, як правило, діагностується у віці до 2 років і зазвичай є білатеральною (рис. 1). При спорадичній формі ретинобластома формується повільніше і часто розвивається тільки в одному оці (див. рис. 1).

Важливо відзначити, що навіть у разі успішного лікування пацієнтів з ретинобластою в подальшому у них часто діагностують остеосаркому і меланому. Остеосаркома (остеогенна саркома) вини-

кає з кістковоутворюючих клітин; її діагностують в основному у віці 10–15 років. Генетичні умови виникнення остеосаркоми аналогічні таким для ретинобластоми: головним чином, спостерігається делеція гена *RB1* [6, 7].

Слід відзначити, що мутації у гені *RB1* характерні для більшості типів злоякісних новоутворень: саркома, гліобластома, рак молочної, підшлункової та парашитовидної залози, рак шийки матки, дрібноклітинна карцинома легені тощо [8].

З метою з'ясувати, яким чином інактивація гена *RB1* призводить до розвитку злоякісних пухлин, було створено нокаутні моделі мишей, за допомогою яких встановлено, що втрата гена *RB1* призводить до ембріональної летальності [9, 10]. Важливо зазначити, що ембріональний розвиток зупиняється на 13–15-му тижні, причому спостерігаються дефекти в диференціюванні еритроцитів та нервових клітин, а також підвищення рівня протеїнів — інгібіторів диференціювання [11, 12].

Приблизно одночасно клонуванням гена *RB1* було показано, що в трансформованих клітинах лінії 293 (також відомий як HEK293, ембріональні первинні клітини нирки людини, трансформовані фрагментом аденовірусу 5) вірусний протеїн E1A утворює комплекс із протеїном з приблизною молекулярною масою 105 кДа [13]. Цей протеїн кодувався геном *RB1*. Цими експериментами показано, що інактивація протеїну RB є однією з необхідних умов для трансформації клітини.

Роль протеїну RB у контролі за проліферацією та диференціюванням клітин. Проте розвиток більшості пухлин не пов'язаний з вірусною інфекцією, тобто білок RB, скоріше за все, має брати участь у контролі за одним з найважливіших шляхів клітини. Було встановлено, що таким шляхом є перехід у фазу S клітинного циклу [6, 14–15]. На молекулярному рівні такий контроль проводиться за рахунок взаємодії

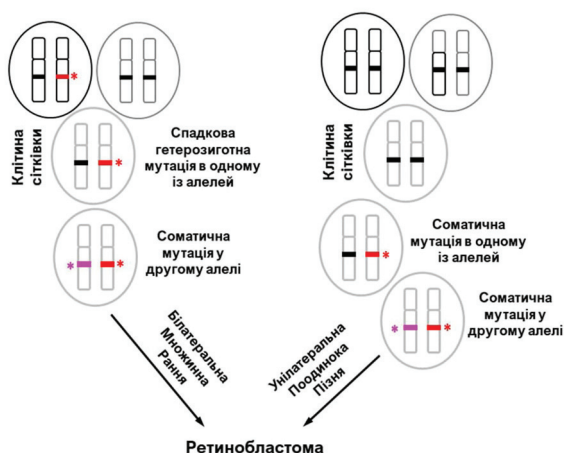


Рис. 1. Модель розвитку різних форм ретинобластоми, згідно з мутаційною теорією Кнудсона. Вроджена мутація при спадковій формі призводить до виникнення білатеральної пухлини у віці до 2 років. При спорадичній формі друга мутація має з'явитися у клітинах сітківки, причому виникає поодинокі пухлина у віці 4–5 років

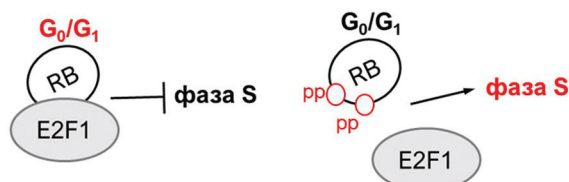


Рис. 2. Схема контролю клітинного циклу за участю протеїну RB. Протеїн RB, як правило, знаходиться у білковому комплексі з протеїном E2F1 у фазі G_0/G_1 клітинного циклу (ліва панель). При фосфорильованні протеїну RB білок E2F1 звільняється і функціонує як фактор транскрипції для генів, продукти яких необхідні для входу у фазу синтезу (права панель)

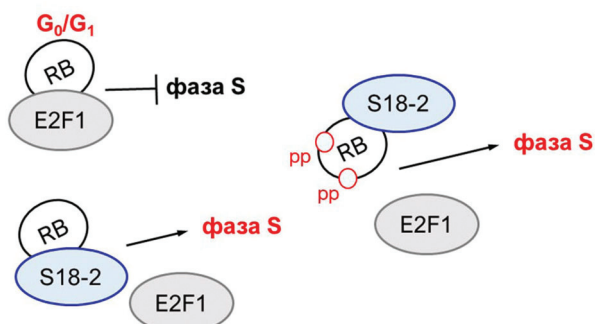


Рис. 3. Схема втрати протеїном RB контролю за клітинним циклом при надекспресії білка S18-2. Протеїн RB як у фосфорильованій, так і у нефосфорильованій формах, взаємодіє з білком S18-2, що призводить до вивільнення фактора транскрипції E2F1, і, таким чином, до транскрипції генів, продукти яких необхідні для входу у фазу синтезу

протеїну RB із фактором транскрипції E2F1 (DNA-binding protein essential for E1A-dependent activation of the adenovirus E2 promoter) [16, 17]. Показано, що фосфорильовання протеїну RB відбувається у фазі клітинного циклу G_0/G_1 , проте його фосфорильована форма практично не детектується у фазах S і G_2/M [6]. Наразі зрозуміло, що при фосфорильо-

ванні протеїну RB відбувається дисоціація білкового комплексу, що містить RB і E2F1, причому останній слугує мастер-активатором транскрипції набору генів, продукти яких потрібні для фази синтезу [18]. Схематично цей процес представлено на рис. 2.

Як правило, клітинний сигнальний шлях RB-E2F1 практично завжди є інактивованим в солідних пухлинах і саркомах. Саме тому при інактивації білка RB (постійно фосфорильований протеїн, делетований ген, що взаємодіє з вірусними білками, тощо) клітина отримує стимул для постійної проліферації [19].

Цікаво, що білок RB в ембріональних стовбурових клітинах наявний як в гіперфосфорильованій формі, тобто не в комплексі з E2F1, так і в гіпофосфорильованих формах [20]. Більше того, в комплексі з E2F1 знаходиться дуже мала частина протеїну RB. Слід зазначити, що саме за таких умов ембріональні клітини проліферують. До цього часу невідомо, які саме молекулярні механізми лежать в основі контролю за стовбуровістю та диференціацією клітин, в яких задіяний протеїн RB [19]. Було висловлено припущення, що для підтримки фенотипу стовбурових клітин потрібна лише невисока концентрація (кількість) протеїну RB. Було показано, що підвищений рівень цього протеїну призводить не лише до диференціювання клітини, а і до зупинки клітинного циклу та індукції апоптозу [20]. З іншого боку, інактивація всіх генів родини RB (*RB1*, *RBL1* та *RBL2*) в ембріональних стовбурових клітинах людини ініціює зупинку фази клітинного циклу G_2/M , що призводить до загибелі клітин за рахунок функціональної активації протеїну TP53, тобто за умов індукції *CDKN1A*, протеїну-інгібітора циклін-залежної кінрази 1A [20]. Наразі зрозуміло, що як втрата, так і надмірна експресія протеїну RB можуть бути летальними для стовбурових клітин.

Виникає питання: чому «нефункціональний» або «неактивний» RB необхідний для підтримання стовбурових клітин і нормального розвитку ряду тканин? Ми вважаємо, що частково це можна пояснити, взявши до уваги взаємодію протеїнів RB і MRPS18-2.

Взаємодія між мітохондріальним рибосомальним протеїном MRPS18-2 та білком RB. Раніше нами було показано, що протеїн RB зв'язується з мітохондріальним рибосомальним білком MRPS18-2 (MRPS18B, S18-2), причому сайт зв'язування припадає на домен «кишенька» («pocket») протеїну RB, що було показано методом поверхневого плазмонного резонансу *in vitro* [21, 22]. У результаті взаємодії S18-2 та RB інгібується утворення комплексу RB-E2F1, тобто функціональним наслідком взаємодії є вивільнення фактора транскрипції E2F1, що є стимулом для переходу клітин у S-фазу та підвищеної проліферативної активності клітин [23] (рис. 3).

Білок S18-2 кодується геном, розташованим на хромосомі 6p21-3. Раніше кДНК виявленого білка S18-2 було клоновано при порівняльному аналізі

експресії генів, мРНК яких експресуються на вищому рівні в гематопоетичних клітинах-попередниках, позитивних за рецептором CD34 [24]. Також відомо, що ген *S18-2* кодує один з трьох білків родини S18, розміщених на поверхні малої субодиниці (28S) мітохондріальної рибосоми ссавців [25, 26].

Варто зазначити, що геном людини кодує три гени *S18* (1–3), тоді як у бактеріях виявлено лише один ген *S18*. Нами було простежено еволюцію білків родини S18 і показано, що ця родина є еволюційно важливою, причому S18-1 (MRPS18C) є найбільш консервативним гомологом бактеріального білка S18. Гени *S18-3*, а потім і *S18-2* з'явилися в результаті дублювання хромосомного матеріалу під час еволюції [27].

Висока експресія білка S18-2 характерна для пухлинних і стовбурових клітин. Неочікувано для нас, надекспресія білка S18-2 у первинних ембріональних фібробластах шурів (ЕФШ) призвела до їх іморталізації з індукцією маркерів ембріональних стовбурових клітин [28]. Іморталізовані ЕФШ не потребували іммобілізації до підложки для активної проліферації. Більше того, такі клітини переходили інгібування росту за рахунок міжклітинних контактів, змінювали морфологію та при нарощуванні високих концентрацій показували можливість спонтанного диференціювання [28]. Загальний патерн експресії генів в іморталізованих ЕФШ практично повторював такий для індукованих плюрипотентних стовбурових клітин і суттєво відрізнявся від профілю експресії генів у первинних ЕФШ [29].

У разі надекспресії протеїну S18-2 у первинних термінально диференційованих фібробластах шкіри щура первинні клітини злоякісно трансформувалися і характеризувалися підвищеною активністю теломерази, порушенням клітинного циклу та значною хромосомною нестабільністю [30].

Підсумовуючи, слід зазначити, що висока експресія протеїну S18-2, що взаємодіє з білком RB, є характерною ознакою іморталізованих, трансформованих, а також стовбурових клітин. Наступним логічним кроком було вивчення патерну експресії гена *S18-2* у пухлинних клітинах.

Так, нещодавно нами було показано, що білок S18-2 експресується на високих рівнях паралельно з високим рівнем вільного E2F1 у пухлинних клітинах раку ендометрію, у порівнянні з гіперплазією і нормальною ендометрією [31]. Також високу експресію протеїну S18-2 було задетектовано в злоякісних клітинах новоутворень передміхурової залози [32]. Слід відзначити, що у клітинах з високим сигналом протеїну S18-2 також детектується високий рівень протеїну CXCR4, який слугує рецептором для хемокіну CXCL12. Відомо, що взаємодія CXCR4, який часто експресується на поверхні епітеліальних клітин, із CXCL12 лежить в основі рухливості таких клітин, що відіграє важливу роль у прогресії пухлин. Нами було показано за допомогою моделі *Danio rerio*, що в результаті високої експресії протеїну S18-2 в пухлинних клітинах, отри-

маних при культивуванні злоякісних новоутворень передміхурової залози, підвищується експресія білків CXCR4 та TWIST2, а також знижується експресія E-кадгерину. Такі зміни, у свою чергу, лежать в основі епітеліально-мезенхімального переходу, який демонструють пухлинні клітини передміхурової залози *in vitro*. Внаслідок цього пухлинні клітини показують підвищену здатність до міграції *in vitro* та *in vivo* [32], тобто надекспресія протеїну S18-2 може зумовлювати метастазування злоякісних клітин.

Підвищену експресію протеїну S18-2 було також виявлено у клітинах гепатоцелюлярної карциноми [33] і в клітинах злоякісних новоутворень молочної залози [34]. Важливо відзначити, що у високотрофічних злоякісних пухлинних клітинах молочної залози експресія протеїну S18-2 була значно вищою, більше того, сигнал цього протеїну частіше виявлявся у ядрі пухлинних клітин [34]. У пухлинах іншого генезу, не епітеліальних, протеїн S18-2 детектується на високому рівні у клітинах лімфом Беркїтта та гострого лімфобластного лейкозу пре-В-клітин. У клітинах зародкових центрів та у лімфобластоїдних клітинах рівень цього протеїну знижувався, а у В-клітинах пам'яті та плазматичних термінально диференційованих клітинах сигнал протеїну S18-2 був найнижчим [35].

Наші результати, а також проведений аналіз опублікованих даних мікрочіпів вказують на підвищену експресію протеїну S18-2 як в стовбурових, так і в пухлинних клітинах. Нами було зроблено висновок, що S18-2 є важливим протеїном, який, подібно до інших протеїнів, таких як OCT4, SOX9, LIN9 та інші, бере участь у контролі диференціювання та проліферації клітин, тобто можуть контролювати стовбуровість клітин та задіяні у розвитку пухлин (рис. 4).

Беручи до уваги вищевикладене, ми висунули гіпотезу, що білки RB і S18-2 кооперують у підтриманні фенотипу стовбурових клітин. Тобто, стовбурові клітини, які можуть бути термінально диференційовані, мають експресувати як RB, так і білок S18-2 [36]. Дерегуляція або інгібування функції внаслідок взаємодії вищевказаних протеїнів з іншими білками (одного або обох цих білків) може призвести до зупинки диференціювання стовбурових клітин і, зрештою, до виникнення пухлини.

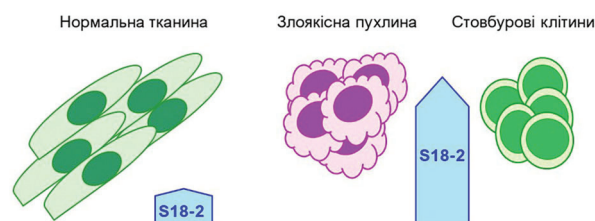


Рис. 4. Схема залежності фенотипу клітин від рівня білка S18-2. Протеїн S18-2 експресується у всіх нормальних тканинах на низькому рівні. Надекспресія цього білка спостерігається у клітинах ряду злоякісних новоутворень та у стовбурових клітинах

Функціональні наслідки взаємодії S18-2 та RB для підтримання фенотипу стовбурових клітин і розвитку пухлин. Запропоновану гіпотезу нами було підтверджено експериментально, з використанням *Rb1*-нокаутних ембріональних фібробластів миші (ЕФМ) та нокаутної моделі *Danio rerio*. Раніше було проведено ряд експериментів з вивчення функціональних наслідків реекспресії протеїну RB у *Rb1*-нокаутних клітинах. Як ми вже обговорювали раніше, протеїн RB наявний в ембріональних стовбурових клітинах як в гіпо-, так і в гіперфосфорильованій формі, тобто він не входить до білкового комплексу E2F1 [20]. За таких умов при інактивації інгібування входу у фазу S-клітинного циклу, ембріональні стовбурові клітини мають проліферувати. З іншого боку, делеція *Rb1* призводить до ембріональної летальності нокаутних мишей [9]. Надекспресія S18-2 в первинних ЕФШ та фібробластах шкіри щура призводила до іморталізації та злоякісної трансформації таких клітин [28, 30]. Для подальшої роботи використовували первинні *Rb1*-нокаутні ЕФМ, RH. При надекспресії S18-2 (RH18) та одночасно S18-2 і RB (RH18RB) у нокаутних клітинах отримували іморталізовані лінії клітин, які швидко проліферували, показали втрату контактної інгібування і ріст, незалежний від підложки, на відміну від вихідних клітин RH і клітин, які експресували тільки протеїн RB, RHRB [37].

Отримані лінії клітин відрізнялися морфологічно, — клітини лінії RH18RB утворювали великі агломерати в бактеріальних чашках Петрі, подібно до ембріональних стовбурових клітин. Клітини ліній RH18 і RH18RB поділялися не менше 350 разів, вони не показали зниження швидкості проліферації при культивуванні *in vitro* протягом 3 років. У таких культурах практично не детектувалися сенесцентні клітини. На відміну від вищеописаних двох ліній, у культурі RH18RB спостерігали найбільшу кількість сенесцентних клітин, як було описано раніше при реконституції протеїну RB у *Rb1*-нокаутні пухлинні клітини людини [38, 39]. Більше того, контрольні RH і RHRB клітини перестали поділятися у культурі за 4–5 тиж.

Поясненням конститутивної проліферації ліній RH18 і RH18RB може бути висока активність теломерази (до 20 аомоль/мкл), яка була на порядок вищою, ніж у клітинах RH та RHRB (не більше 2 аомоль/мкл).

Важливим є те, що клітини RH18RB диференціювали під дією специфічних коктейлів хімічних речовин, причому отримували клітини, характерні для остеогенного, хондрогенного та адипогенного диференціювання.

Для пояснення показаного феномену було проведено аналіз промоторної області гена *S18-2*, яку ми ідентифікували на ділянці -600 п.о. від початку стартового кодона ATG. Методом біоінформатичного аналізу було показано, що один із факторів Яманаки (Yamanaka-factor), що задіяний в індуку-

ванні плюрипотентності, KLF4, регулює експресію гена *S18-2* за рахунок прямого зв'язування з промотором *S18-2* [37].

Іншим важливим відкриттям стало те, що при високому рівні ектопічного протеїну S18-2, білок RB локалізувався не тільки в ядрі, а і в цитоплазмі клітин RH18RB. Більше того, ці два білки було ідентифіковано у супрамолекулярному комплексі, який містив також прогібітін, RING1, RNF2 та гістон H2A. Підвищений рівень моно-убіквітування Lys119 гістону H2A було виявлено в клітинах лінії RH18RB [37]. Важливість формування такого протеїнового комплексу демонструє той факт, що дефіцит протеїну RNF2 призводить до летальності ембріона за рахунок зупинки гастрюляції та гальмування прогресії клітинного циклу [40].

Як вказано вище, для нормального функціонування клітини потрібне точне регулювання експресії протеїнів S18-2 і RB. Важливість такого регулювання для S18-2 було продемонстровано за допомогою моделі *Danio rerio*: інгібування синтезу протеїну S18-2 призводить до загибелі ембріонів на етапі гастрюляції [37].

Таким чином, для демонстрації клітинами фенотипу стовбурових клітин експресія обох взаємодіючих протеїнів, RB і S18-2, є необхідною умовою. У таких клітинах RB функціонує за межами звичайного контролю клітинного циклу, тобто переходу до фазі S. Цей висновок узгоджується з попередніми даними щодо обмеженого контролю протеїном RB переходу до фази S клітинного циклу в стовбурових клітинах [20]. Фактор транскрипції KLF4, який може індукувати стовбуровість, зв'язується з промоторною ділянкою гена *S18-2* і може, таким чином, регулювати його експресію. Більше того, протеїн S18-2 задіяний у створенні супрамолекулярного комплексу, в який також входять протеїни RNF2, RING1, прогібітін і RB. Утворення такого протеїнового комплексу посилює ферментативну активність білка RNF2, який є E3-убіквітин-лігазою для гістону H2A. Моно-убіквітинований гістон H2A є характерною ознакою ембріональних стовбурових клітин (рис. 5).

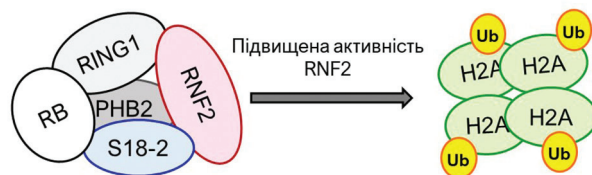


Рис. 5. Схема функціональних наслідків взаємодії протеїнів RB і S18-2. При підвищеній експресії протеїну S18-2 формується супрамолекулярний комплекс, який містить такі білки, як RB, прогібітін (PHB2), RING1 та RNF2. При цьому підвищується ферментативна активність протеїну RNF2, що слугує E3-лігазою убіквітину для гістону H2A. Моноубіквітинований гістон H2A є характерним для стовбурових клітин, тому що він підтримує репресію генів, які викликають диференціювання

Підсумовуючи, зазначимо, що нами було визначено раніше невідомі функції мітохондріального рибосомального білка S18-2, який кодовано ядерним геномом. Було підтверджено, що білки RB і S18-2 кооперуються у підтриманні фенотипу стовбурових клітин, результатом порушення балансу у їх експресії є виникнення пухлин. Також нами виявлено функціональні наслідки взаємодії протеїнів RB і S18-2 у контролі за стовбуровістю клітин та їх диференціюванням. Продемонстровано, що білок S18-2 є потужним онкопротейном. На основі аналізу результатів власних досліджень та даних, опублікованих іншими авторами, можна припустити, що зниження рівнів S18-2 може бути потенційно успішною стратегією для лікування пацієнтів зі злоякісними пухлинами.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Sage J. The retinoblastoma tumor suppressor and stem cell biology. *Genes Dev* 2012; **26** (13): 1409–20.
2. Mittnacht S. The retinoblastoma protein — from bench to bedside. *Eur J Cell Biol* 2005; **84** (2–3): 97–107.
3. Lee WH, Bookstein R, Hong F, *et al.* Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 1987; **235** (4794): 1394–9.
4. Zhu L. Tumour suppressor retinoblastoma protein Rb: a transcriptional regulator. *Eur J Cancer* 2005; **41** (16): 2415–27.
5. Knudson AG. Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; **68** (4): 820–23.
6. DeCaprio JA, Ludlow JW, Lynch D, *et al.* The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* 1989; **58** (6): 1085–95.
7. Thomas DM, Carty SA, Piscopo DM, *et al.* The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Mol Cell* 2001; **8** (2): 303–16.
8. Weinberg RA. The biology of cancer. USA: Garland Science, Taylor and Francis group; 2007.
9. Lipinski MM, Jacks T. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene* 1999; **18** (55): 7873–82.
10. Khidr L, Chen PL. RB, the conductor that orchestrates life, death and differentiation. *Oncogene* 2006; **25** (38): 5210–9.
11. Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, *et al.* Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 1992; **359** (6393): 295–300.
12. Jacks T. Modeling cancer in the mouse. *Harvey Lect* 2005; **101**: 1–19.
13. Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, *et al.* Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988; **334** (6178): 124–9.
14. Goodrich DW, Wang NP, Qian YW, *et al.* The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 1991; **67** (2): 293–302.
15. Goodrich DW. The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. *Oncogene* 2006; **25** (38): 5233–43.
16. Bagchi S, Weinmann R, Raychaudhuri P. The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. *Cell* 1991; **65** (6): 1063–72.
17. Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, *et al.* The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 1991; **65** (6): 1053–61.
18. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993; **73** (6): 1059–65.
19. Mushtaq M, Giza HV, Kashuba EV. Role of the RB-Interacting Proteins in Stem Cell Biology. *Adv Cancer Res* 2016; **131**: 133–57.
20. Conklin JF, Baker J, Sage J. The RB family is required for the self-renewal and survival of human embryonic stem cells. *Nature communications* 2012; **3**: 1244.
21. Snopok B, Yurchenko M, Szekely L, Klein G, Kashuba E. SPR-based immunocapture approach to creating an interfacial sensing architecture: Mapping of the MRS18–2 binding site on retinoblastoma protein. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2006; **386** (7–8): 2063–73.
22. Snopok BA, Darekar S, Kashuba EV. Analysis of protein-protein interactions in a complex environment: capture of an analyte-receptor complex with standard additions of the receptor (CARSAR) approach. *The Analyst* 2012; **137** (16): 3767–72.
23. Kashuba E, Yurchenko M, Yenamandra SP, *et al.* 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; **105** (14): 5489–94.
24. Zhang QH, Ye M, Wu XY, *et al.* Cloning and functional analysis of cDNAs with open reading frames for 300 previously undefined genes expressed in CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells. *Genome research* 2000; **10** (10): 1546–60.
25. Suzuki T, Terasaki M, Takemoto-Hori C, *et al.* Proteomic analysis of the mammalian mitochondrial ribosome. Identification of protein components in the 28 S small subunit. *J Biol Chem* 2001; **276** (35): 33181–95.
26. Cavdar Koc E, Burkhart W, Blackburn K, *et al.* The small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. Identification of the full complement of ribosomal proteins present. *J Biol Chem* 2001; **276** (22): 19363–74.
27. Mushtaq M, Ali RH, Kashuba V, Klein G, Kashuba E. S18 family of mitochondrial ribosomal proteins: evolutionary history and Gly132 polymorphism in colon carcinoma. *Oncotarget* 2016; **7** (34): 55649–62.
28. Kashuba E, Yenamandra SP, Darekar SD, *et al.* MRPS18–2 protein immortalizes primary rat embryonic fibroblasts and endows them with stem cell-like properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106** (47): 19866–71.
29. Yenamandra SP, Darekar SD, Kashuba V, *et al.* Stem cell gene expression in MRPS18–2-immortalized rat embryonic fibroblasts. *Cell Death Dis* 2012; **3**: e357.
30. Darekar SD, Mushtaq M, Gurrapu S, Yenamandra SP, Darekar SD. Mitochondrial ribosomal protein S18–2 evokes chromosomal instability and transforms primary rat skin fibroblasts. *Oncotarget* 2015; **6** (25): 21016–28.
31. Mints M, Mushtaq M, Iurchenko N, *et al.* Mitochondrial ribosomal protein S18–2 is highly expressed in endometrial cancers along with free E2F1. *Oncotarget* 2016; **7** (16): 22150–8.
32. Mushtaq M, Jensen L, Davidsson S, *et al.* The MRPS18–2 protein levels correlate with prostate tumor progression and it induces CXCR4-dependent migration of cancer cells. *Sci Rep* 2018; **8** (1): 2268.
33. Buivydiene A, Liakina V, Valantinas J, *et al.* 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; **9** (3): 108–14.
34. Buchynska LG, Iurchenko NP, Kashuba EV, *et al.* Overexpression of the mitochondrial ribosomal protein S18–2 in the invasive breast carcinomas. *Exp oncol* 2018; **40** (4): 303–8.
35. Kovalevska L, Kashuba E. Expression pattern of MRPS18 family genes in malignantly transformed b-cells. *Exp oncol* 2020; **42** (4): 295–9.
36. Kashuba E, Mushtaq M. Do MRPS18–2 and RB proteins cooperate to control cell stemness and differentiation, preventing cancer development? *Experimental oncology* 2017; **39** (1): 12–6.
37. Mushtaq M, Kovalevska L, Darekar S, *et al.* Cell stemness is maintained upon concurrent expression of RB and the mitochondrial ribosomal protein S18–2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020; **117** (27): 15673–83.
38. Banerjee A, Xu HJ, Hu SX, *et al.* Changes in growth and tumorigenicity following reconstitution of retinoblastoma gene

function in various human cancer cell types by microcell transfer of chromosome 13. *Cancer Res* 1992; **52** (22): 6297–304.

39. **Pagliaro LC, Antelman D, Johnson DE, et al.** Recombinant human retinoblastoma protein inhibits cancer cell growth. *Cell Growth Differ* 1995; **6** (6): 673–80.

40. **Voncken JW, Roelen BA, Roefs M, et al.** Rnf2 (Ring1b) deficiency causes gastrulation arrest and cell cycle inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100** (5): 2468–7243.

FUNCTIONAL CONSEQUENCES OF INTERACTION BETWEEN MRPS18-2 AND RB PROTEINS UPON CELL TRANSFORMATION

L.M. Kovalevska, E.V. Kashuba

*R.E. Kavetsky Institute of experimental pathology,
oncology and radiobiology of NAS of Ukraine, Kyiv,
Ukraine*

The article is devoted to analyzing the literature data and the presentation of its own data about of previously unknown functions of the mitochondrial ribosomal protein S18-2, which is encoded by the nuclear genome. Here, we describe that RB and S18-2 proteins cooper-

ate in maintaining of a stem cell phenotype; imbalance in their expression might lead to tumor development. The functional consequences of the RB-S18-2 interaction in the control on cell stemness and their differentiation were also analyzed. Evidences are presented that the S18-2 protein is a potent oncoprotein. We may suggest that reducing levels of the S18-2 protein might be a putative strategy for treating malignancies.

Key Words: mitochondrial ribosomal protein, MRPS18-2 protein, cell immortalization, cell transformation, malignant neoplasms, stem cells, RB protein

Адреса для листування:

Кашуба О.В.

Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

E-mail: Kashuba@nas.gov.ua, lenakash@yahoo.com

Одержано: 15.06.2021