УДК 577.112+577.113 https://doi.org/10.7124/FEEO.v39.1839

СУШНЬОВА А. В.
ХРЕЩЕНЮК В. С.
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
✉ *Kashuba@nas.gov.ua, lenakash@yahoo.com*

СТАБІЛЬНІСТЬ мРНК ТА ПРОТЕЇНІВ РОДИНИ MRPS18 *IN VITRO*

Мета. Родина MRPS18 (MRPS18-1-3) складається з білків, які формують малу субодиницю мітохондріальної рибосоми. Крім того, MRPS18-2 проявляє екстрарибосомні функції, а саме, бере участь у контролі клітинного циклу, апоптозі, епітеліально-мезенхімальному переході та підтримці плюрипотентності. Даних щодо стабільності мРНК генів родини MRPS18 немає. Тому метою даної роботи було дослідити стабільність мРНК генів родини MRPS18 (*MRPS18-1-3*) та їх білкових продуктів *in vitro*. ***Методи.*** Деградацію мРНК оцінювали після обробки пухлинних клітин раку грудної залози MCF7 і клітин рабдоміосаркоми TE671 актиноміцином D за допомогою кількісної ПЛР (кПЛР). Протеасомну деградацію білків вивчали *in vitro* за допомогою конструкцій у векторі pGEM та системи екстракту зародків пшениці T7/SP6 Coupled Wheat Germ Extract System. ***Результати.*** мРНК MRPS18-2 характеризувалася найнижчою стабільністю серед проаналізованих транскриптів у лінії клітин MCF7, на відміну від білка MRPS18-2, який показав високу стабільність. мРНК *MRPS18-1* та *MRPS18-3* продемонстрували вищу стабільність, тоді як кодовані даними генами білки деградували швидше. ***Висновки.*** Необхідні нові дослідження для розуміння впливу стабільності мРНК та протеїна на функції білка MRPS18-2.

Ключові слова: мітохондріальні рибосомні білки, MRPS18, MRPS18-2, деградація мРНК, деградація білка, протеасоми.

Родина мітоходріальних рибосомних протеїнів MRPS18 складається із трьох членів – MRPS18-1 (MRPS18C), MRPS18-2 (MRPS18B) і MRPS18-3 (MRPS18A). Дані білки кодуються геномами всіх *metazoan*, проте бактерії мають лише один гомолог (Penzo et al., 2019). 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 (Greber et al., 2014; Greber et al., 2015). Важливо відзначити, що всі три гени мають загального анцестора – бактеріальний протеїн MRPS18. У всіх *metazoan* тричі пройшла дуплікація первинного гена, тому наразі існують три різних протеїни (Mushtaq et al., 2016).

Нами було показано, що MRPS18-2 є онкопротеїном: високий рівень сигналу даного білка спостерігається у пухлинних клітинах різних нозологій, наприклад, при раку ендометрію (Mints et al., 2016), передміхурової залози (Mushtaq et al., 2018), грудної залози (Buchynska et al., 2018), В-клітинній лімфомі (Kovalevska and Kashuba, 2020) і раку головного мозку (Kovalevska et al., 2021; Kovalevska et al., 2025). Протеїн MRPS18-2 бере пряму участь у регуляції клітинного циклу за рахунок взаємодії із білком ретинобластоми (RB), таким чином знімаючи інгібування переходу G_1-S (Kashuba et al., 2008).

Раніше нами було показано, що протеїн MRPS18-2 характеризується високою стабільністю (Feshina et al., 2022), проте немає інформації щодо швидкості деградації кодуючої мРНК. Відомо, що баланс між синтезом та деградацією мРНК є ключовим фактором клітинного гомеостазу, що контролює експресію генів та долю клітини у відповідь на вплив навколишнього середовища та метаболічні сигнали. Регуляція розпаду мРНК не лише впливає на динаміку транскрипції, але й служить механізмом контролю якості для видалення аберантних мРНК (Agarwal and Kelley, 2022).

© 2026 Сушньова А. В., Хрещенюк В. С., Ковалевська Л. М., Кашуба О. В. This work is licensed under CC BY 4.0. To view a copy of this license, visit https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Тому метою даної роботи було вивчення стабільності мРНК генів родини MRPS18, що допоможе визначити вплив стабільності мРНК і білків на біологічні функції протеїнів.

Матеріали і методи

Лінії клітин та обробка актиноміцином D

У роботі використовували лінію раку грудної залози MCF-7 та рабдоміосаркоми TE671. Клітини культивували у середовищі Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), доповненому L-глутаміном, (BioWest, Франція), з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (Sigma, США). Культивування проводилось в атмосфері з 5% CO_2 при температурі 37 °C.

Для дослідження кінетики розпаду мРНК клітини розсаджували у 6-лункові планшети, висіваючи по 200 000 клітин у кожну лунку. Експеримент проводили в дублікатах. Після додавання актиноміцину D (10 мкг/мл) наряду з контрольною точкою 0 відбірали проби через 1, 2, 4, 8 та 24 години. До клітин після промивки фосфатним буфером (PBS) додавали 320 мкл реагента TRIzol (ThermoFisher Scientific, США), після чого мРНК виділяли за стандартним протоколом.

Проведення реакції зворотної транскрипції (ЗТ) та к-ПЛР

Отриману мРНК (кінцева концентрація приблизно 25 нг/мкл) використовували для синтезу кДНК в об'ємі 32 мкл за допомогою набору для зворотної транскрипції RevertAid RT (Termo Fisher Scientific, США). Під час першого кроку отриману мРНК залежно від концентрації змішували з водою до 22 млк, додавали oligoDt в об'ємі 1 мкл та dNTPs в об'ємі 3 мкл, та інкубували 5 хвилин при температурі 65 °C. У другому кроці до отриманого епендорфу додавали Revertase та Ribolock в об'ємі 1 мкл та 5x Buffer у об'ємі 4 мкл, та інкубували одну годину при температурі 42 °C.

Для оцінки експресії генів родини MRPS18 використовували метод кПЛР. Реакційна суміш для ампліфікації містила 2 мкл кДНК, 4 мкл 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix (Solis BioDyne, Естонія), 13 мкл води без РНКаз, та 1 мкл суміші прямих та зворотніх праймерів з кінцевою концентрацією 25 pM (табл. 1). Кожну реакцію проводили в двократному повторенні у триплікатах та нормалізували відповідно до експресії мРНК *TBP* (ген кодує TATA binding protein), що слугував внутрішнім контролем. Для порівняння рівнів експресії генів родини MRPS18 із внутрішнім контролем використовували відносну кількісну оцінку (метод порівняльного Ct (ΔΔCt)).

Вивчення розкладу протеїнів на протеасомах in vitro

Трансляцію білків родини MRPS18 *in vitro* було проведено із плазмід у векторі pGEM, який містить SP6 промотер, використовуючи T7/SP6 Coupled Wheat Germ Extract System (Promega, США), як описано у протоколі виробника. Метіонін, мічений S^{35}, було придбано у GE Healthcare Bio-Sciences AB (Швеція). Білки розділяли на 10-12.5% поліакриламідному гелі (ПААГ) із додаванням додецилсульфата натрію, після чого висушували при температурі 80 ℃ і тиску приблизно 2,7 кПа. Протеїни візуалізували на фосфоіміджері Тайфун (GE Healthcare Bio-Sciences AB).

Деградацію протеїнів на протеасомах *in vitro* вивчали, як було описано раніше (Ciechanover, 1994), використовуючи лізати ретикулоцитів та/або лізати клітин HeLa при 37 ℃. Очищену субодиницю 26S отримали із Calbiochem (США). Деградацію протеїнів проводили на протязі 0–4 годин із лізатами ретикулоцитів та/або лізатів клітин HeLa при 37 ℃. Білки розділяли на 10–12.5% ПААГ, після чого висушували при температурі 80 ℃і 2,7 кПа. Протеїни візуалізували на фосфоіміджері Тайфун.

Для обчислення інтерполяції стандартних кривих і побудови графіків відносної експресії генів використовували програмне забезпечення GraphPad Prism (версія 9, GraphPad Software, La Jolla, США).

Таблиця 1. Послідовності праймерів, які були використані в дослідженні

Ген	5' → 3'	3' → 5'
TBP	TTTCTTGCCAGTCTGGAC	CACGAACCACGGCACTGATT
MRPS18-1 (C)	CAGGTATCCAGCAATGAGGACC	GCATCCAGTAAATGGAGAAACAAAC
MRPS18-2 (B)	CACAGCGGACTCGGAAGACATG	GCGCAGACAAATTGCTCCAAGAG
MRPS18-3 (A)	CATCTGCCGTTGGAACCTTGAAG	CTTGCGGTGTTCTTCCTGGCAT

Результати та обговорення

Для вивчення стабільності мРНК вищевказаних генів було використано актиноміцин D, що зупиняє транскрипцію РНК, перешкоджаючи дії ДНК-залежної РНК-полімерази. Актиноміцин D застосовується як цитостатичний препарат для лікування пухлини Вільямса та рабдоміосаркоми. Слід відзначити, що патерн експресії генів родини MRPS18 дещо відмінний у лініях клітин, отриманих із пухлин різної нозологій.

Так, у лінії пухлинних клітин грудної залози MCF7 мРНК гена *MRPS18-2* характеризується найменшою стабільністю серед досліджуваних транскриптів, з періодом напіврозпаду приблизно 15–16 годин (рис. 1). мРНК гена *MRPS18-1* мала вищу стабільність із періодом напіврозпаду близько 20 годин. Найстабільнішою виявилась мРНК гена *MRPS18-3*, період напіврозпаду якої становив приблизно 22–23 години (рис. 1).

Водночас аналіз деградації протеїнів на протеасомах *in vitro* показав, що білок *MRPS18-2* має найдовший період напіврозпаду серед трьох білків (див. нижче і в (Feshina et al., 2022)).

Натомість *MRPS18-1*, мРНК якого деградувала найповільніше, показав найшвидшу деградацію на рівні білкового продукту. *MRPS18-3* займає проміжну позицію як за стабільністю мРНК, так і за швидкістю деградації білка. Отримані результати дозволяють припустити існування оберненої залежності між стабільністю мРНК та білка у лінії клітин MCF7.

У лінії клітин рабдоміосаркоми TE671 спостерігали дещо іншу картину щодо стабільності мРНК генів родини MRPS18. Так, деградація мРНК гена *MRPS18-1* відбувалася доволі швидко під час дії актиноміцину D (рис. 2).

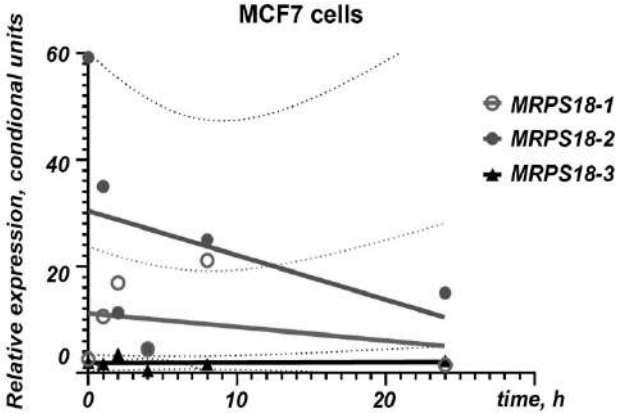


Рис. 1. Залежність величин відносної експресії генів *MRPS18-1-3* на рівні мРНК у культурі клітин MCF7 від часу дії актиноміцину D.

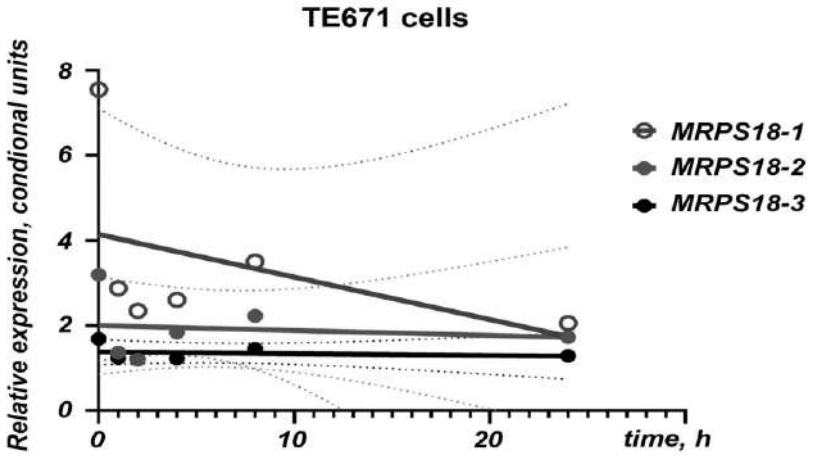


Рис. 2. Залежність величин відносної експресії генів *MRPS18-1-3* на рівні мРНК у культурі клітин TE671 від періоду дії актиноміцину D.

Розрахований період напів розпаду становив приблизно 14,7 годин. Незначна зміна визначеної кількості мРНК решти генів вказує на те, що період напіврозпаду становить більше 20 годин, що є типовим для більшості генів (Yang et al., 2003; Wang and Liu, 2022).

Для вивчення розкладу протеїнів *in vitro* використовували синтезовані протеїни та комерційні реагенти – убіквітин (мономер), альдегід убіквітину, E1, E2 та суміш лігаз убіквітина E3 із лізатів ретикулоцитів. Всі компоненти і отримані протеїни змішували на льоду. Реакцію деградації проводили при 37 ℃ на протязі чотирьох годин.

Надалі аналізували реакцію у ПААГ; після висушування гелю радіаційну мітку аналізували на апараті Тайфун, як описано у розділі Матеріали і методи. Виявлено, що протеїн MRPS18-1 розкладається дуже швидко, за час до 20 хвилин (рис. 3). Можливо, в його деградації беруть участь протеази, а не тільки протеасоми. Кінетика розкладу протеїна MRPS18-1 була вражаючою – за 30 хвилин спостерігали розклад коло 80% вихідної концентрації білка, навіть при використанні менш активної фракції III лізату ретикулоцитів.

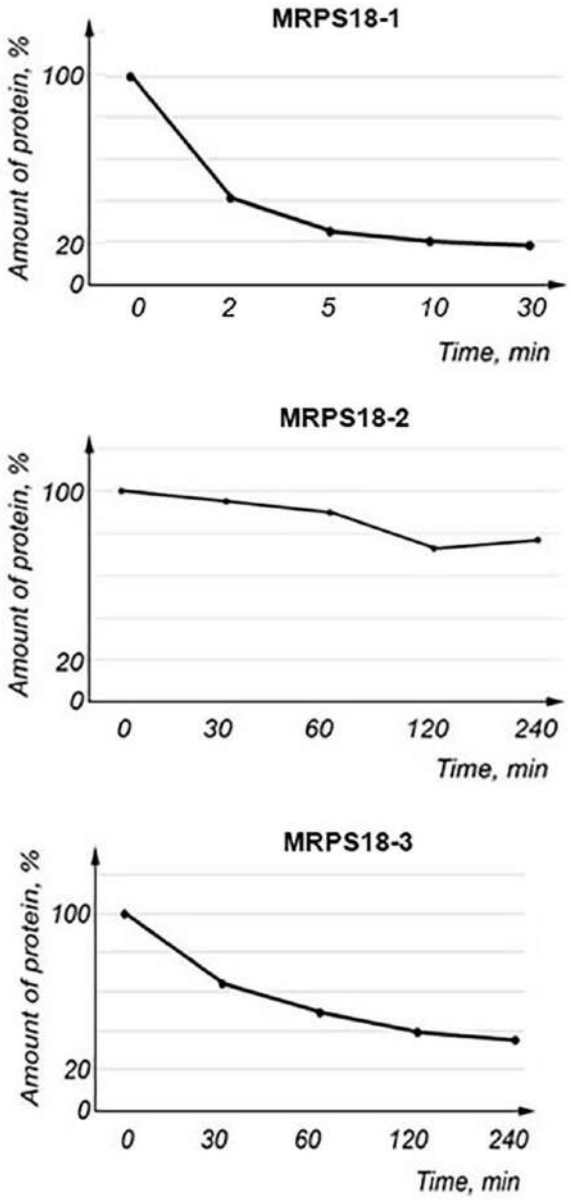


Рис. 3. Деградація білків родини MRPS18, отриманих за допомоги трансляції *in vitro* у присутності лізату ретикулоцитів і субодиниці протеасоми 20S. Верхня панель – кінетика деградації протеїна MRPS18-1, середня панель – MRPS18-2, нижня панель – MRPS18-3.

Несподіваною виявилась реакція деградації протеїну MRPS18-2 – він практично не розкладався, навіть при використанні повного лізату ретикулоцитів (рис. 3) протягом 4-х годин; більше 80% протеїна не руйнувалося за цей час. Важливо відмітити, що при використанні менш активної фракції II лізату ретикулоцитів не спостерігалося деградації протеїна MRPS18-2 взагалі, тобто він є надзвичайно стабільним.

Протеїн MRPS18-3 розкладався із звичайною кінетикою – 60% кількості білка руйнувалося за 4 години із використанням лізату ретикулоцитів (рис. 3). Слід відзначити, що фракція II лізату ретикулоцитів була менш активною для цього протеїну, проте спостерігали деградацію білка MRPS18-3 і при застосуванні фракції II лізату ретикулоцитів.

Висновки

Підсумовуючи, отримані експериментальні дані свідчать, що гени родини MRPS18 та їх білкові продукти мають різні біохімічні властивості та, найімовірніше, функції в життєдіяльності клітини. Важливо відмітити, що ці властивості також можуть змінюватися в залежності від природи клітин. Так, у клітинах рабдоміосаркоми TE671 найшвидше інгібується транскрипція гена *MRPS18-1*, в той час, як у лінії клітин пухлини грудної залози MCF7 найнижчою стабільністю характеризується мРНК гена *MRPS18-2* з періодом напіврозпаду приблизно 15–16 годин. В цих клітинах найстабільнішою виявилась мРНК гена *MRPS18-3*, період напіврозпаду якої становив приблизно 22–23 години.

Отримані результати вказують на те, що білки родини MRPS18 можуть мати різні функції та різні молекулярні механізми у клітинних процесах. Висока стабільність MRPS18-2 порівняно з іншими білками цієї родини вказує на необхідність подальших досліджень його ролі в клітинних процесах.

Інформація про фінансову підтримку, подяки: Робота була підтримана грантом № 0123U100099 НАН України «Вивчення молекулярних механізмів пригнічення росту ембріональних пухлин шляхом інактивації білка MRPS18-2».

Конфлікт інтересів: автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

References

1. Agarwal V., Kelley D. R. The genetic and biochemical determinants of mRNA degradation rates in mammals. *Genome Biology*. 2022. Vol. 23. P. 245–273. https://doi.org/10.1186/s13059-022-02811-x.
2. Buchynska L. G., Iurchenko N. P., Kashuba E. V., Brieieva O. V., Glushchenko N. M., Mints M., Lukianova N. Yu., Chekhun V. F. Overexpression of the mitochondrial ribosomal protein S18-2 in the invasive breast carcinomas. *Experimental Oncology*. 2018. Vol. 40. P. 303–308.
3. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*. 1994. Vol. 79. P. 13–21. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90396-4.
4. Feshina M. O., Kovalevska L. M., Kashuba O. V. Study on ubiquitination of proteins of the MRPS18 family *in vitro*. *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv.* 2022. Vol. 30. P. 116–121. https://doi.org/10.7124/FEEO.v30.1471.
5. Greber B. J., Boehringer D., Leitner A., Bieri P., Voigts-Hoffmann F., Erzberger J. P., Leibundgut M., Aebersold R., Ban N. Architecture of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Nature.* 2014. Vol. 505. P. 515–519. https://doi.org/10.1038/nature12890.
6. Greber B. J., Bieri P., Leibundgut M., Leitner A., Aebersold R., Boehringer D., Ban N. Ribosome. The complete structure of the 55S mammalian mitochondrial ribosome. *Science*. 2015. Vol. 348. P. 303–308. https://doi.org/10.1126/science.aaa3872.
7. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008. Vol. 105. P. 5489–5494. https://doi.org/10.1073/pnas.0801053105.
8. Kovalevska L., Kalman S., Sushnova A., Malysheva O., Rozumenko V., Malysheva T., Kashuba E. Differential Expression of MRPS18 Family Genes in Brain Tumor Samples. *Experimental Oncology*. 2025. Vol. 46. P. 368–374. https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2024.04.368.
9. Kovalevska L., Kashuba E. Expression pattern of MRPS18 family genes in malignantly transformed b-cells. *Experimental Oncology*. 2020. Vol. 42. P. 295–299. https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-4.15366.
10. Kovalevska L., Malysheva T. A., Kalman S., Rozumenko A. V., Verbova L., Rozumenko V. D., Kashuba E. Expression pattern of MRPS18 family genes in gliomas. *Experimental Oncology*. 2021. Vol. 43. P. 204–208. https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no-3.16461.
11. 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. https://doi.org/10.18632/oncotarget.7905.
12. 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. https://doi.org/10.18632/oncotarget.10957.

13. Mushtaq M., Jensen L., Davidsson S., Grygoruk O. V., Andrén O., Kashuba V., Kashuba E. The MRPS18-2 protein levels correlate with prostate tumor progression and it induces CXCR4-dependent migration of cancer cells. *Scientific Reports.* 2018. Vol. 8. P. 2268–2282. https://doi.org/10.1038/s41598-018-20765-8.
14. Penzo M., Montanaro L., Trere D., Derenzini M. The Ribosome Biogenesis-Cancer Connection. *Cells.* 2019. Vol 8. P. 55–70. https://doi.org/10.3390/cells8010055.
15. Wang C., Liu H. Factors influencing degradation kinetics of mRNAs and half-lives of microRNAs, circRNAs, lncRNAs in blood *in vitro* using quantitative PCR. *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12. P. 7259–7270. https://doi.org/10.1038/s41598-022-11339-w.
16. Yang E., van Nimwegen E., Zavolan M., Rajewsky N., Schroeder M., Magnasco M., Darnell J. E. Jr. Decay rates of human mRNAs: correlation with functional characteristics and sequence attributes. *Genome Research*. 2003. Vol. 13. P. 1863–1872. https://doi.org/10.1101/gr.1272403.

SUSHNOVA A. V., CHRESHCHENYUK V. S., KOVALEVSKA L. M., KASHUBA E. V.
R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of National Academy of Sciences of Ukraine,
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 45

STABILITY OF mRNA AND PROTEINS OF THE MRPS18 FAMILY *IN VITRO*

Aim. The MRPS18 family (MRPS18-1-3) consists of proteins that are the building blocks of the small subunit of the mitochondrial ribosome. Besides, MRPS18-2 exhibit extra-ribosomal functions, taking a part in the cell cycle control, apoptosis, epithelial-mesenchymal transition, and maintenance of pluripotency. There are no data on mRNA stability of MRPS18 family genes. We wanted to examine the stability of mRNA of MRPS18 family genes (*MRPS18-1-3*) and their protein products *in vitro*. ***Methods.*** The mRNA degradation was assessed upon treatment in cells of breast carcinoma MCF7 and rhabdomyosarcomas TE671 with actinomycin D by a quantitative PCR (qPCR). Proteasomal degradation of proteins were studied *in vitro*, using pGEM constructs and T7/SP6 Coupled Wheat Germ Extract System. ***Results.*** The *MRPS18-2* mRNA was characterized by the lowest stability among the analysed transcripts in MCF7 cells, on the contrary to the MRPS18-2 protein that showed a high stability. mRNA of *MRPS18-1* and *MRPS18-3* demonstrated the higher stability, while these proteins degraded with the higher rate. ***Conclusions.*** More should be done to understand how mRNA and protein stability influence the MRPS18-2 protein functions.
Keywords: mitochondrial ribosomal proteins, MRPS18, MRPS18-2, mRNA degradation, protein degradation, proteasomes.

Надходження статті: 30 квітня 2026 р.
Прийняття до друку після рецензування: 29 червня 2026 р.
Публікація: 30 листопада 2026 р.