

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол №____ засідання кафедри

від “____” _____ 20__ р.

**ПРОЛІФЕРАЦІЯ КЛІТИН ЛІНІЇ SAOS-2 ОСТЕОСАРКОМИ ЗА ДІЇ
ЗЛИТОГО ПРОТЕЇНУ GFP-MRPS18-2**

Кваліфікаційна робота бакалавра
денної форми навчання
за спеціальністю
Біотехнології та біоінженерія
Татарової Вероніки Сергіївни

Науковий керівник від кафедри
канд. біол. наук, доц. Юет А.С.

Робота виконана у лабораторії молекулярних механізмів трансформації клітин
Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України під керівництвом завідувача лабораторії,
д-ра. біол. наук, проф. Кашуби Олени Віталіївни

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ЕДТА	– етилендіамінтетраоцтова кислота;
ЦНС	– центральна нервова система;
AT/RT	– atypical teratoid/rhabdoid tumor (атипова тератоїдна/рабдоїдна пухлина);
BCOR	– BCL6 corepressor (корепресор BCL6);
CDK	– cyclin-dependent kinase (циклінзалежна кінза);
CNS5	– The World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors, 5th edition (Класифікація пухлин центральної нервової системи Всесвітньої організації охорони здоров'я, 5-те видання);
E2F1	– E2F transcription factor 1 (фактор транскрипції E2F1);
EBNA-6	– Epstein-Barr nuclear antigen 6 (ядерний антиген вірусу Епштейна-Барр 6);
G418	– geneticin (генетицин);
GFP	– Green Fluorescent Protein (зелений флуоресцентний білок);
LB	– Lysogeny broth (лізогенне середовище);
LT	– large T antigen (великий Т-антиген, вірусний онкобілок SV40);
LxCxE	– leucine-X-cysteine-X-glutamate (консервативний пептидний мотив лейцин-Х-цистеїн-Х-глутамат);
MRPS18-2	– mitochondrial ribosomal protein S18-2 (мітохондріальний рибосомальний білок S18-2);
MYC (c-MYC)	– myelocytomatosis oncogene (протоонкоген c-MYC);

OCT4	–	octamer-binding transcription factor	4
		(октамер-зв'язуючий фактор транскрипції 4);	
PBS	–	Phosphate Buffered Saline	(фосфатно-сольовий буферний розчин);
PHB2	–	prohibitin 2	(прогібітин 2);
PNET	–	primitive neuroectodermal tumor	(примітивна нейроектодермальна пухлина);
<i>RB1</i>	–	retinoblastoma gene 1	(ген ретинобластоми 1);
RBL1 (p107)	–	retinoblastoma-like protein	1
		(ретинобластомоподібний білок 1);	
RBL2 (p130)	–	retinoblastoma-like protein	2
		(ретинобластомоподібний білок 2);	
RH18RB	–	клітинна лінія ембріональних фібробластів миші з надекспресією S18-2 та RB;	
RNF2	–	ring finger protein 2	(убіквітин E3-лігаза RNF2);
S18-1	–	mitochondrial ribosomal protein	S18-1
		(мітохондріальний рибосомальний білок S18-1);	
S18-3	–	mitochondrial ribosomal protein	S18-3
		(мітохондріальний рибосомальний білок S18-3);	
Saos-2	–	Sarcoma osteogenic-2	(клітинна лінія остеосаркоми людини);
SCID	–	severe combined immunodeficiency	(тяжкий комбінований імунодефіцит);
SV40	–	simian virus 40	(мавпячий вірус 40);
TOP-10	–	<i>Escherichia coli</i> TOP-10	(штам <i>E. coli</i> TOP-10);
TP53	–	tumor protein p53	(пухлинний білок p53);
WHO	–	The World Health Organization	(Всесвітня організація охорони здоров'я).

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Шлях RB-E2F1 та його роль у розвитку остеосаркоми	7
1.1. Ембріональні пухлини	7
1.2. Ретинобластома та шлях RB-E2F1	9
1.3. Остеосаркома	12
1.4. Способи інактивації шляху Rb-E2F1	15
1.5. Проліферація клітин Saos-2 та за дії злитого білка GFP-MRPS18-2	20
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень	22
2.1. Реактиви та обладнання.....	22
2.2. Трансформація клітин <i>Escherichia coli</i>	23
2.3. Виділення плазмідної ДНК	23
2.4. Культивування клітин.....	24
2.5. Трансфекція клітин лінії Saos-2 та отримання стабільної сублінії	25
2.6. Виділення РНК	26
2.7. Синтез кДНК на матриці РНК	27
2.8. ПЛР у реальному часі	27
2.9. Аналіз туморогенності клітин <i>in vivo</i> , на моделі мишей SCID	29
2.10. Гістологічне забарвлення гематоксиліном та еозином	30
2.11. Статистична обробка результатів.....	30
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	32
3.1. Отримання сублінії Saos-2 зі стабільною надекспресією MRPS18-2	32
3.2. Аналіз рівня експресії генів <i>MRPS18-1</i> , <i>MRPS18-2</i> та <i>C-MYC</i> у сублінії Saos-2- <i>MRPS18-2</i>	33
3.3. Аналіз туморогенності клітин Saos-2 та Saos-2- <i>MRPS18-2</i> на моделі мишей SCID	35
3.4. Гістологічний аналіз експериментальних пухлин	39
ВИСНОВКИ	42
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	43

ВСТУП

Остеосаркома – це злоякісна пухлина кісткової тканини мезенхімального походження, при якій інактивація супресорів пухлинного росту, зокрема білка ретинобластоми (RB) та TP53 (пухлинний білок p53), є одним із ключових молекулярних механізмів патогенезу. Оскільки клітинна лінія Saos-2 не має функціональних форм вищезазначених білків, вона часто використовується як модельна система для вивчення регуляції клітинного циклу та проліферації пухлинних клітин [1].

Мітохондріальний рибосомальний білок S18-2 (MRPS18-2) є структурним компонентом малої субодиниці (28S) міторибосоми ссавців. Ген кодується ядерним геномом і розташований на хромосомі 6p21.3 [2]. Окрім структурної функції у складі міторибосоми, цей білок також задіяний у регуляції клітинного циклу: MRPS18-2 зв'язується з доменом «кишенька» RB, витісняючи звідти фактор транскрипції E2F1, що стимулює перехід клітини з G₁ у S-фазу [3, 4]. Було показано, що надекспресія MRPS18-2 у первинних фіброблестах призводить до їх іморталізації, набуття маркерів стовбурових клітин та злоякісної трансформації з хромосомною нестабільністю [5, 6]. Також спостерігалось підвищення рівня білка MRPS18-2 у пухлинах ендометрію, молочної та передміхурової залоз, а також у гепатоцелюлярній карциномі. При цьому для перших трьох типів пухлин експресія MRPS18-2 корелювала зі ступенем злоякісності, тоді як у гепатоцелюлярній карциномі такої кореляції виявлено не було [7].

За даними аналізу бази «The Cancer Cell Line Encyclopedia» (CCLE, Енциклопедія ліній ракових клітин), клітинні лінії остеосарком характеризуються відносно низьким рівнем експресії MRPS18-2 [8]. Це явище виглядає парадоксально, оскільки саме при остеосаркомі *RB1* (ген ретинобластоми 1) найчастіше є інактивованим. Через те, що основний описаний механізм дії MRPS18-2 реалізується через взаємодію з RB, а клітини Saos-2, у свою чергу, позбавлені функціонального RB, залишається відкритим

питання: як надекспресія MRPS18-2 вплине на проліферацію цих клітин і чи існують RB-незалежні механізми його дії.

З огляду на вищезазначене, метою роботи було проаналізувати проліферацію клітин лінії Saos-2 остеосаркоми за дії злитого протеїну GFP-MRPS18-2.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

1. Отримати стабільну сублінію Saos-2 з експресією MRPS18-2 шляхом трансфекції плазмідним конструктом GFP-MRPS18-2.
2. Встановити експресію MRPS18-2.
3. Оцінити канцерогенний потенціал первинної лінії Saos-2 та сублінії Saos-2-MRPS18-2 *in vivo*, на моделі імунодефіцитних мишей лінії SCID (тяжкий комбінований імунодефіцит).
4. Провести гістологічний аналіз сформованих експериментальних пухлин.

РОЗДІЛ 1

ШЛЯХ RB-E2F1 ТА ЙОГО РОЛЬ У РОЗВИТКУ ОСТЕОСАРКОМИ

1.1. Ембріональні пухлини

Ембріональні пухлини – це гетерогенна група злоякісних новоутворень, що складається переважно з недиференційованих клітин, які морфологічно нагадують тканини органа-попередника на стадії ембріогенезу. При патогістологічному дослідженні в них виявляють недиференційовані або слабодиференційовані клітини з високим мітотичним індексом, що може відображати збережені властивості ранніх ембріональних клітин-попередників [9].

Ембріональні пухлини виникають переважно у дітей раннього віку та рідко зустрічаються у дорослих. За даними Німецького реєстру дитячого раку, вони становлять близько 20 % усіх злоякісних новоутворень дитячого віку (8337 випадків на 1991-2012 рр.). Найвищі показники захворюваності для більшості нозологічних форм спостерігаються на першому році життя, за винятком медулобластоми, пік якої припадає на вік від 1 до 9 років. Серед позацентральных ембріональних пухлин найчастіше діагностують нейробластому (стандартизована за віком захворюваність 13,7 на мільйон) та нефробластому (9,4 на мільйон). Показники виживаності суттєво різняться: найвищі – для ретинобластоми (5-річна виживаність – 98 %) та нефробластоми (92 %), найнижчі – для АТ/РТ (атипова тератоїдна/рабдоїдна пухлина) (32 %) та PNET (примітивна нейроектодермальна пухлина) (38 %). Відзначається також переважання хлопчиків серед хворих на медулобластому та гепатобластому [10].

За локалізацією ембріональні пухлини поділяють на пухлини ЦНС (центрально нервова система) та позацентральноні. В рамках Міжнародної класифікації дитячого раку третього видання (International Classification of

Childhood Cancer, 3rd edition, ICCC-3) виділяють такі групи: IIIc – внутрішньочерепні та інтраспінальні ембріональні пухлини; IV – нейробластома та інші пухлини периферичної нервової системи; V – ретинобластома; VIa – нефробластома та інші неепітеліальні пухлини нирок; VIIa – гепатобластома; XII – інші неуточнені злоякісні новоутворення, зокрема легеневі та плевропульмональні бластоми [10].

Тривалий час схожість гістологічної картини між підтипами призводила до діагностичних помилок, оскільки AT/RT нерідко приймали за PNET, медулобластоми, рідше за карциному судинного сплетення або герміногенну пухлину. Встановлення того, що делеції або мутації локусу *SMARCB1* (компонент комплексу ремоделювання хроматину SWI/SNF) на хромосомі 22q11.2 є характерною ознакою рабдоїдних пухлин ЦНС, стало важливим діагностичним орієнтиром. Негативний результат імуногістохімічного дослідження на *SMARCB1* нині є одним із ключових критеріїв верифікації AT/RT.

До 2016 р. всі немедулобластомні ембріональні пухлини ЦНС групувалися під терміном CNS-PNET. Класифікація Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) у 2016 р. вперше інтегрувала генетичні дані в діагностичну систему й вилучила цей термін, виявивши, що під ним приховувались біологічно різні утворення [11]. Цей підхід було суттєво розвинуто у п'ятому виданні класифікації ВООЗ 2021 р. (WHO CNS5), яке значно розширило молекулярну класифікацію ембріональних пухлин ЦНС та виділило нові нозологічні одиниці [12, 13]. Згідно з WHO CNS5, окрім медулобластоми виділяють: AT/RT (з трьома молекулярними підгрупами); ембріональну пухлину з багат шаровими розетками (ETMR), яка характеризується ампліфікацією кластера *C19MC* (кластер мікроРНК на хромосомі 19) або, рідше, мутацією *DICER1* (ген-супресор пухлин, задіяний у процесингу РНК); CNS нейробластоми, *FOXR2*-активовану (транскрипційний фактор *FOXR2*); та пухлину ЦНС із *BCOR* (внутрішня тандемна дуплікація *BCOR*). Дві останні нозології є новими для WHO CNS5. Для пухлин, що не

піддаються точнішій класифікації, збережено загальне позначення «ембріональна пухлина ЦНС» з уточненнями NOS (без додаткових уточнень) або NEC (не класифіковані в іншому місці). Найкраще охарактеризованим прикладом молекулярної субкласифікації є медулобластома, геномний аналіз якої показав чотири молекулярних підтипи: WNT (сигнальний шлях Wnt), SHH (сигнальний шлях Sonic Hedgehog), група 3 і група 4 – кожен з яких має власний молекулярний профіль, вікову структуру і прогноз. Серед інших ембріональних пухлин особливе місце посідає ретинобластома – пухлина, вивчення якої привело до відкриття першого гена-супресора пухлинного росту *RB1* і заклало основи сучасного розуміння генетики раку [12,13].

1.2. Ретинобластома та шлях RB-E2F1

Ретинобластома – це спорадична або спадкова пухлина сітківки ока, що виникає переважно у дітей. Зазвичай при спадковій формі діагноз встановлюється до 2 років, пухлина білатеральна; в той час як при спорадичній формі пухлина розвивається пізніше, і зазвичай вражає одне око. Специфічний вік виникнення пухлини у дітей свідчить про те, що її розвиток залежить від проліферації клітин, які лише тимчасово присутні у сітківці, що розвивається. Відмінності між двома формами пояснює мутаційна гіпотеза Кнудсона 1971 р. («two-hit hypothesis»): для утворення пухлини необхідна інактивація обох алелей відповідного гена. При спадковій формі одна мутація вже успадкована, тому для другої мутації потрібно менше часу. При спорадичній формі обидві мутації виникають *de novo* в соматичних клітинах сітківки [14].

Ген *RB1* є першим клонованим геном-супресором пухлинного росту, який був ізольований методом позиційного клонування у 1986 р. Відомо, що він охоплює понад 180 тисяч пар нуклеотидів (т. п. н.) геномної ДНК на хромосомі 13q14 та складається з 27 екзонів. Транскрипт розміром 4,7 т. п. н. кодує

ядерний фосфопротеїн із 928 амінокислот – білок RB, або p105. Мутації *RBI* виявлено не лише при ретинобластомі, вони також трапляються при саркомах, гліобlastомах, дрібноклітинному раку легені, раку сечового міхура, шийки матки, парашитовидних залоз. Крім RB, у людини є ще два споріднених білки: RBL1/p107 (ретинобластомоподібний білок 1) та RBL2/p130 (ретинобластомоподібний білок 2), гени яких розташовані на хромосомах 20q11.2 та 16q12.2 відповідно. Усі три білки об'єднані під назвою «кишенькових» (pocket proteins) завдяки спільному структурному домену «кишенька», утвореному двома консервативними субдоменами А і В, розділеними спейсером. Саме цей домен є мішенню для вірусних онкобілків під час вірусіндукованої трансформації клітин. Варто зазначити, що мутації в *RBL1* та *RBL2* при злоякісних пухлинах людини трапляються вкрай рідко [14].

Основною функцією білка RB є регуляція клітинного циклу через пряме зв'язування з фактором транскрипції E2F1 та пригнічення його транскрипційної активності. E2F1 та інші члени родини E2F активують гени, продукти яких необхідні переходу клітини у S-фазу. Варто зазначити, що лише нефосфорильована форма RB може утворювати комплекс з E2F1. У випадку фосфорилування RB вказаний комплекс дисоціює і E2F1 вивільняється.

Фосфорилування RB відбувається поетапно і залежить від стадії клітинного циклу. У фазі G₁ його здійснюють циклінзалежні кінази CDK4 і CDK6 у комплексі з цикліном D, який слугує для них направляючою молекулою. У решті клітинного циклу вже діють CDK1, CDK2 і CDK3 у комплексі з цикліном E та цикліном A (рис. 1.1). Важливо, що клітина може інгібувати фосфорилування завдяки інгібіторам CDK. Перша група (CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CDKN2D) блокує саме CDK4 і CDK6, запобігаючи фосфорилуванню RB на ранньому етапі G₁. Друга група (CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C) діє на CDK1, 2 і 3 на пізніших стадіях циклу. Таким чином, рівень фосфорилування RB є результатом балансу між активністю кіназ та їх інгібіторів, і саме цей баланс визначає, чи залишається E2F1 неактивним у комплексі з RB, чи стає транскрипційним фактором [14].

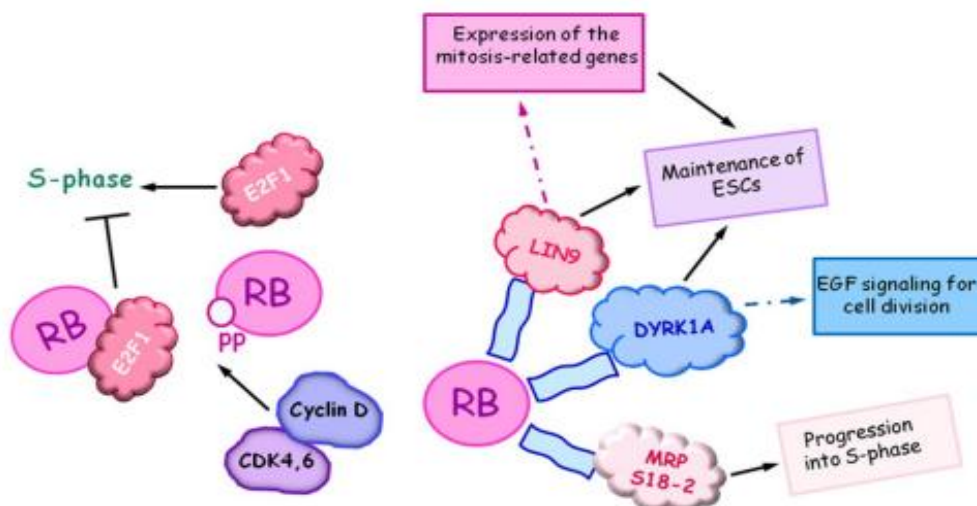


Рис. 1.1. Схема контролю S-фази клітинного циклу за участю білка RB. Ліва панель: нефосфорильований RB зв'язується з E2F1, інгібуючи його транскрипційну активність; при фосфорилуванні RB комплекс дисоціює і клітина входить у S-фазу. Права панель: у стовбурових клітинах RB задіяний у регуляції клітинного циклу через взаємодію з LIN9, DYRK1A та S18-2. Адаптовано з [14]

Шлях RB-E2F1 практично завжди інактивований у солідних пухлинах та саркомах. Механізм при цьому варіює. При ретинобластомі та остеосаркомі переважає делеція *RB1*. При меланомі метилування промоторів *CDKN2A* та *CDKN2B* на хромосомі 9 знижує рівні p16 і p15, CDK4/6 не інгібуються, RB надмірно фосфорилується і E2F1 залишається вільним. При нейробластомі надекспресія *MYCN* (онкоген сімейства *MYC*) активує ген *ID2* (інгібітор зв'язування ДНК 2), продукт якого конкурує з E2F1 за зв'язування з RB. Результат той самий: вільний E2F1 і стимуляція проліферації. Іншими механізмами інактивації є мутації та делеції *RB1*, епігенетичне замовчування його промотора, мутації в генах *CDK*, рекрутування білків, що блокують асоціацію RB з E2F1 [14].

В ембріональних стовбурових клітинах RB присутній переважно у гіпер- та гіпофосфорильованій формах і практично не перебуває в комплексі з E2F1, що й забезпечує їх активну проліферацію. Разом із тим підвищення

активності RB у цих клітинах ініціює диференціювання, зупинку клітинного циклу та загибель; інактивація ж усієї родини RB (RB1, RBL1, RBL2) спричиняє зупинку у фазі G₂/M через активацію шляху TP53, зокрема індукцію CDKN1A. Нокаут *Rbl* у мишей призводить до ембріональної летальності приблизно на 13-15 день розвитку з дефектами диференціювання еритроцитів та нервових клітин [14]. Таким чином, питання про те, чому «неактивний» RB необхідний для підтримки стовбуровості клітин і нормального розвитку тканин, залишається відкритим.

1.3. Остеосаркома

Остеосаркома – найпоширеніша первинна злоякісна пухлина кісткової тканини, що виникає з мезенхімальних клітин-попередників остеобластів. Хоча остеосаркома належить до відносно рідкісних злоякісних новоутворень, серед дитячих онкологічних захворювань вона посідає восьме місце за частотою, поступаючись лейкозіям, пухлинам ЦНС, нейробластомі, пухлині Вільмса, неходжкінським лімфомам, рабдоміосаркомі та ретинобластомі. Розподіл захворюваності за віком є бімодальним: перший пік припадає на вікову групу 10-14 років і збігається з пубертатним ростовим стрибком, а другий на осіб старше 50 років, у яких виникнення остеосаркоми нерідко асоційоване з хворобою Педжета та іншими станами, що супроводжуються порушенням ремоделювання кістки [15, 16].

Пухлина має виражену анатомічну вибірковість. Вона типово виникає в метафізах довгих трубчастих кісток, тобто саме в тих ділянках, де відбувається найактивніший ріст. Найчастіше уражуються дистальний відділ стегнової кістки (42 %), проксимальний відділ великогомілкової кістки (19 %) та проксимальний відділ плечової кістки (10 %); загалом на метафізи довгих кісток нижніх кінцівок припадає близько 75 % випадків [15, 16]. Конвенційна остеосаркома є найпоширенішим типом і складає приблизно 80 % усіх

випадків; за переважаючим типом клітин її поділяють на остеобластичну, хондробластичну та фібробластичну форми, хоча клінічно ці підтипи мають подібний перебіг. На тканинному рівні остеосаркома характеризується порушенням балансу між резорбцією та формуванням кістки. Посилена активність остеокластів поєднується з компенсаторним відкладанням остеїдного позаклітинного матриксу реактивними остеобластами, що призводить до формування гетерогенної картини – мозаїки остеобластичних, остеолітичних та змішаних вогнищ. При остеобластичній формі утворюється щільна маса незрілої кісткової тканини, що проростає кортикальний шар; при остеолітичній формі переважає деструкція з мінімальним відкладанням матриксу [16].

Конкретний тип клітин, з якої бере початок остеосаркома, досі не ідентифікований, проте найбільш вірогідним кандидатом є мезенхімальна стовбурова клітина, що вступила на шлях остеогенної диференціації. Молекулярними порушеннями при остеосаркомі є хромосомні аберації та мутації генів-супресорів пухлинного росту *TP53* і *RB1*, а також онкогену *Ras*. П'ятирічна виживаність при локалізованих формах остеосаркоми нині становить 60-70 %, що стало можливим завдяки впровадженню комбінованої хіміотерапії у 1970-х роках (до того цей показник не перевищував 20 %). Проте для пацієнтів з метастатичним ураженням прогноз залишається несприятливим, оскільки п'ятирічна виживаність складає лише 20-30 %. Водночас показники виживаності при остеосаркомі фактично не змінювалися впродовж останніх десятиліть, попри вдосконалення хірургічних методів. За результатами мета-аналізу Zhang [17], що узагальнили дані публікацій за останнє десятиліття, кожен із таких факторів незалежно погіршує прогноз при остеосаркомі: чоловіча стать, вік старше 20 років, розташування пухлини поза кінцівками, розмір пухлини понад 5 см та погана відповідь [17].

Хоча більшість випадків остеосаркоми є спорадичними, відомі спадкові синдроми зі значно підвищеним ризиком цієї пухлини. Насамперед синдром Лі-Фраумені (гермінальна мутація *TP53*) та спадкова ретинобластома

(гермінальна мутація *RB1*). Зв'язок між остеосаркомою та ретинобластою зумовлений тим, що обидва захворювання пов'язані з інактивацією гена *RB1*. Пацієнти з гермінальними мутаціями цього гена мають підвищений ризик вторинних злоякісних пухлин, серед яких остеосаркома та саркоми м'яких тканин є найчастішими [18]. Схильність до остеосаркоми реалізується переважно у другому десятилітті життя, що відповідає періоду активного росту скелета. Окрім того, описані випадки, коли остеосаркома розвивалася як перша злоякісна пухлина у носіїв гермінальних мутацій *RB1* без попередньої ретинобластоми. Такі спостереження зафіксовані, зокрема, для низькопенетрантних варіантів гена і вказують на ширший клінічний спектр спадкової схильності, асоційованої з *RB1*, ніж вважалося раніше [19].

Роль білка RB у схильності до остеосаркоми не обмежується контролем клітинного циклу через зв'язування з E2F1. Дані кількох досліджень свідчать про його участь у регуляції остеогенної диференціації – зокрема, через взаємодію з RUNX2 (runt-споріднений фактор транскрипції 2), ключовим транскрипційним фактором, що керує дозріванням остеобластів [20, 21]. Мезенхімальні стовбурові клітини, виділені з орбітальної жирової тканини пацієнтів зі спадковою ретинобластою, було порівняно з клітинами осіб із диким типом *RB1*. Виявилося, що гетерозиготна мутація *RB1* призводить до зниження експресії не лише самого *RB1*, а й низки інших генів-супресорів, і водночас порушує експресію маркерів остеогенного диференціювання. Автори розглядають ці зміни як можливий початковий етап патогенезу остеосаркоми: порушення нормального дозрівання остеобластів утримує клітини у недиференційованому проліферативному стані, а подальші генетичні порушення, такі як інактивація другого алеля *RB1* або мутація *TP53* здатні завершити процес малігнізації. Цей сценарій підтверджується також дослідженнями, в яких мезенхімальні стовбурові клітини з дефіцитом *TP53* і RB спрямовувалися до остеосаркомогенезу після обробки кондиціонованим середовищем клітин Saos-2 та впливу фізичних сигналів кальцифікованого

субстрату, що підкреслює значення генетичних порушень, і кісткового мікрооточення у розвитку остеосаркоми [19, 22, 23].

1.4. Способи інактивації шляху Rb-E2F1

Як було зазначено вище, родина «кишенькових» білків – RB (RB1), p107 (RBL1) та p130 (RBL2) – спільно контролює перехід G₁-фази в S-фазу переважно через інгібування транскрипційних факторів родини E2F. Одним із найвивченіших прикладів інактивації цього шляху є взаємодія pocket-білків з вірусними онкобілками [26].

LT (великий T-антиген) вірусу SV40 обходить механізм контролю клітинного циклу завдяки консервативному пептидному мотиву LxCxE (консервативний пептидний мотив лейцин-X-цистеїн-X-глутамат), який зв'язується із ущелиною B-субдомену pocket-домену RB [24, 25]. Аналогічний мотив присутній і в інших вірусних онкобілках, таких як E7 вірусу папіломи людини (HPV) та E1A аденовірусу, що робить його універсальним інструментом вірус-індукованої інактивації pocket-білків. Зв'язування цих онкобілків через LxCxE призводить до руйнування репресивних комплексів pocket-білків з E2F, що стимулює проліферацію і може сприяти клітинній трансформації [26, 27].

Характерною рисою SV40 LT є здатність інактивувати не лише RB, а й p107 та p130. Це було продемонстровано за допомогою ко-імунопреципітації в клітинах 293T, в яких SV40-LT ко-преципітувався з усіма трьома pocket-білками. У дослідженнях на клітинах Saos-2 кожен із pocket-білків при ектопічній експресії спричиняв зупинку клітинного циклу та репресію E2F-генів-мішеней. SV40-LT був здатний перешкоджати цим ефектам для всіх трьох білків. Для порівняння – LT поліомавірусу клітин Меркеля (MCPyV) у тих самих умовах ко-імунопреципітації виявив переважне зв'язування з RB і практично не впливав на функції p107 і p130. Така широка специфічність

SV40-LT щодо всієї родини pocket-білків, ймовірно, і пояснює його високу трансформуючу активність у різних типах клітин [26, 27].

Взаємодія вірусних онкобілків з pocket-доменом RB залежить від ступеня фосфорилування RB. Фосфорилування по T821/T826 кіназами CDK2 або CDK4 індукує внутрішньомолекулярну взаємодію між C-кінцевою ділянкою pRb та pocket В доменом, що безпосередньо перешкоджає зв'язуванню LxCxE-вмісних білків, у тому числі вірусних. Інші сайти фосфорилування впливають переважно на зв'язування E2F: так, фосфорилування по T356/T373 спричиняє стикування N-кінцевого домену з pocket-доменом і частково блокує взаємодію RB із доменом трансактивації E2F. Отже, фосфорилування RB по T821/T826 створює структурну перешкоду для зв'язування LxCxE-вмісних білків [28], що пояснює, чому саме нефосфорильована, активна форма RB є основною мішенню вірусних онкобілків при інактивації шляху RB-E2F.

Окрім вірусних онкобілків, шлях RB-E2F1 може бути інактивований клітинними білками, що безпосередньо конкурують з E2F1 за зв'язування з pocket-доменом RB. Одним із таких білків є мітохондріальний рибосомальний протеїн MRPS18-2. Методом поверхневого плазмонного резонансу *in vitro* було встановлено, що MRPS18-2 зв'язується саме з pocket-доменом RB, який є мішенню вірусних онкобілків SV40 LT і HPV E7. Відмінність MRPS18-2 від цих вірусних факторів полягає в тому, що він зв'язує обидві форми RB – як нефосфорильовану, так і фосфорильовану, – тоді як вірусні онкобілки переважно діють на нефосфорильовану форму. Внаслідок зв'язування MRPS18-2 з RB порушується формування репресивного комплексу RB-E2F1. Фактор транскрипції E2F1 вивільняється і активує транскрипцію генів, необхідних для входу клітини у S-фазу (рис. 1.2).

Білок MRPS18-2 належить до родини MRPS18, що складається з трьох гомологів у тварин (MRPS18-1-3) і лише одного – у бактерій. Усі три білки кодуються ядерним геномом. Ген *MRPS18-2* людини розташований на хромосомі 6p21.3 і кодує білок із 258 амінокислотних залишків. У структурі мітохондріальної рибосоми ссавців 55S протеїни MRPS18-1 і MRPS18-2

входять до складу малої субодиниці 28S, тоді як MRPS18-3 є компонентом великої субодиниці 39S. Аналіз еволюційної історії родини S18 показав, що у ході еволюції еукаріот відбулася дуплікація прадавнього бактеріального гена *S18*, причому у метазоях цей процес повторився тричі. Внаслідок першого раунду дуплікації виник ген *MRPS18-3* та предок генів *MRPS18-1* і *MRPS18-2*; другий раунд дав початок генам *MRPS18-1* і *MRPS18-2*. Найконсервативнішим гомологом залишається *MRPS18-1*, в той час як *MRPS18-2* мутує з вищою частотою порівняно з *MRPS18-1* і *MRPS18-3*, що підтверджено аналізом даних бази COSMIC [29, 30].

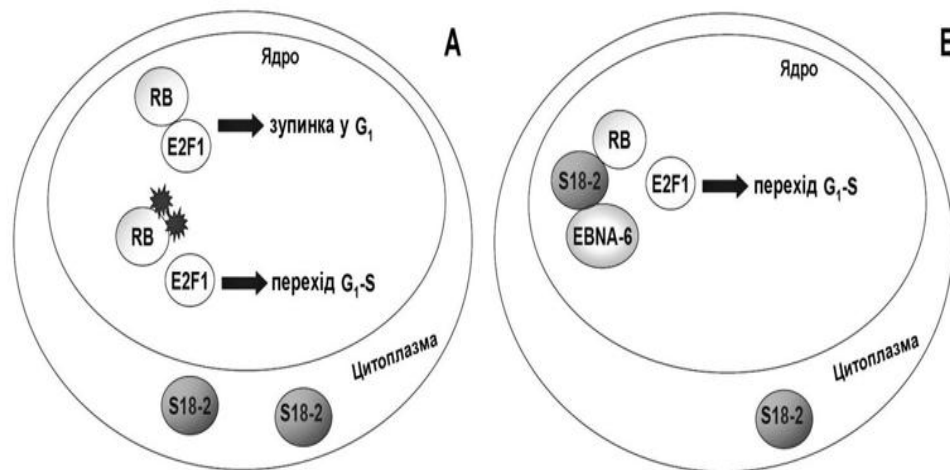


Рис. 1.2. Схема блокування функції протеїну RB у лімфобластоїдних клітинах. Участь ядерного антигену EBNA-6 у переході G₁/S внаслідок взаємодії білків RB і MRPS18-2 після інфікування В-клітин вірусом Епштейна-Барр (Б). Неінфіковану клітину, в якій MRPS18-2, в основному, цитоплазматичний, представлено на лівій панелі (А). Адаптовано із [3]

Білок MRPS18-2 був вперше ідентифікований у контексті трансформації В-лімфоцитів вірусом Епштейна-Барр (Epstein Barr virus, EBV). За допомогою дріжджової двогібридної системи було встановлено, що вірусний ядерний антиген EBNA-6 зв'язується з MRPS18-2 і транслокує його до ядра клітини. У неінфікованих клітинах MRPS18-2 локалізується переважно в цитоплазмі; у

присутності EBNA-6 ядерний S18-2 взаємодіє з RB, внаслідок чого з комплексів RB-E2F1 вивільняється E2F1, що стимулює перехід клітин у S-фазу [3, 4, 7].

Отже, у процесі EBV-індукованої трансформації MRPS18-2 виступає посередником у порушенні комплексу RB-E2F1. Функціональні наслідки надекспресії MRPS18-2 були вивчені на первинних ембріональних фібробластах щура. Надекспресія MRPS18-2 призводила до іморталізації клітин з індукцією маркерів ембріональних стовбурових клітин – SOX2, OCT4, FUT4 (SSEA-1) та KLF4 [14]. Аналіз профілів генної експресії у іморталізованих клітинах виявив зміни у 4000 генів та щонайменше 19 клітинних шляхів, причому активованими виявилися шляхи, характерні для плюрипотентних стовбурових клітин [5, 7].

У термінально диференційованих первинних фібробластах шкіри щура надекспресія MRPS18-2 спричиняла злаякісну трансформацію: трансформовані клітини проходили понад 300 подвоєнь популяції, втрачали контактне інгібування, набували ріст незалежний від субстрату, а один з трьох досліджених клонів (клон 6) утворював пухлини у двох з трьох піддослідних тварин. Трансформовані клітини демонстрували підвищену активність теломерази, порушення клітинного циклу та виражену хромосомну нестабільність – кількість хромосом у метафазах варіювала від 70 до 79 [31].

З метою поглибленого вивчення ролі одночасної експресії RB і MRPS18-2 у контролі стовбуровості клітин було використано модель *Rb1*-нокаутних ембріональних фібробластів миші. Одночасна надекспресія MRPS18-2 і RB (лінія RH18RB) призводила до іморталізації нокаутних клітин та формування фенотипу ембріональних стовбурових клітин: клітини утворювали щільні агломерати, характерні для ембріональних стовбурових клітин, і позитивно забарвлювалися на SSEA4 (маркер стовбуровості та агресивності пухлинних клітин). Клітини RH18RB пройшли понад 350 подвоєнь популяції *in vitro* впродовж більш ніж 2 років, а при введенні в SCID-мишей утворювали агресивні фібросаркоми. Важливою ознакою цих клітин

була здатність до мультилінійної диференціації *in vitro*: при використанні відповідних хімічних коктейлів RH18RB-клітини диференціювалися в остеогенному, хондрогенному та адипогенному напрямках [6]. Роль MRPS18-2 у підтриманні стовбуровості підтверджена також на людських мезенхімальних стовбурових клітинах. Нокдаун *MRPS18-2* призводив до зниження рівня *c-MYC*, тоді як спільний нокдаун *MRPS18-2* і *RBI* синергетично пригнічував експресію *OCT4* (октамер-зв'язуючий фактор транскрипції 4) і *NANOG* (гомеобоксний білок). Імунопреципітація з мас-спектрометричним аналізом виявила, що MRPS18-2 входить до складу супрамолекулярного комплексу разом із RB, прогібітином 2 (PHB2) та убіквітин-Е3-лігазою RNF2. Формування цього комплексу підвищує Е3-лігазну активність RNF2, що призводить до посиленого моноубіквітинування гістону H2A по залишку Lys119. Така модифікація гістону є характерною ознакою ембріональних стовбурових клітин і пов'язана з пригніченням транскрипції генів диференціації [4, 6].

Підвищена експресія *MRPS18-2* виявлена при широкому спектрі злоякісних новоутворень людини: пухлинах ендометрію, де високий рівень MRPS18-2 корелює з підвищеним вмістом вільного E2F1, пухлинах передміхурової та молочної залоз, гепатоцелюлярній карциномі, лімфомах Беркїтта та гострому лімфобластному лейкозі пре-В-клітин, а також гліомах. У В-клітинах найвищий рівень MRPS18-2 зафіксований у клітинах зародкових центрів та у пухлинних В-клітинних лініях, тоді як у термінально диференційованих плазматичних клітинах сигнал MRPS18-2 є найнижчим [7].

Отже, було припущено, що стовбурові клітини, які зберігають потенціал до термінальної диференціації, мають одночасно експресувати обидва білки. Порушення балансу їхньої експресії може спричиняти зрив диференціації стовбурових клітин і, як наслідок, пухлиноутворення [4, 8].

1.5. Проліферація клітин Saos-2 та за дії злитого білка GFP-MRPS18-2

Для вивчення впливу конструкту GFP-MRPS18-2 на проліферацію клітин було обрано клітинну лінію Saos-2. Ця лінія була отримана 1973 р. з первинної остеогенної саркоми 11-річної пацієнтки і з того часу широко використовується як модель для дослідження остеосаркоми та молекулярних механізмів клітинного циклу [32].

Saos-2 є моделлю остеосаркоми, тобто пухлини з інактивованим шляхом RB-E2F1, що безпосередньо відповідає темі роботи. Принципово важливо, що клітини Saos-2 повністю позбавлені власного функціонального білка RB. Завдяки цьому при введенні в них зовнішніх білків, що взаємодіють з RB, результат не буде спотворений присутністю ендogenous RB, і Saos-2 фактично слугує «чистою» системою для таких досліджень. Це підтверджено експериментально: при ектопічній експресії будь-якого з pocket-білків у Saos-2 спостерігається чітка і відтворювана зупинка клітинного циклу та репресія E2F-залежних генів [26]. Окрім того, клітини Saos-2 зберігають виражений остеобластний фенотип із значно вищою активністю лужної фосфатази порівняно з іншими остеосаркомними лініями, що робить їх біологічно релевантною моделлю саме для дослідження остеосаркоми [32].

Конструкт GFP-MRPS18-2 являє собою злитий білок, в якому рамка зчитування білка MRPS18-2 співпадає і транскрибується з 5'-кінця гена, кодуючого GFP (зелений флуоресцентний білок). Такий підхід дозволяє одночасно спостерігати місцезнаходження білка MRPS18-2 в клітині та оцінювати наслідки його надекспресії для клітинного поділу без необхідності додаткового мічення. В попередніх дослідженнях злитий білок GFP-S18-2 виявлявся як в цитоплазмі, так і в ядрі клітини, що відповідає його функції як конкурентного інгібітора комплексу RB-E2F1 [5].

Отже, для дослідження впливу надекспресії MRPS18-2 на проліферацію було обрано клітинну лінію Saos-2, оскільки вона є усталеною моделлю остеосаркоми і водночас повністю позбавлена функціонального білка RB. Це

дозволяє дослідити дію MRPS18-2 у системі без ендогенного RB, де результат не спотворюється присутністю основної описаної мішені цього білка. Використання конструкту GFP-MRPS18-2, у свою чергу, дає можливість одночасно відстежувати локалізацію білка в клітині та оцінювати наслідки його надекспресії для клітинного поділу без додаткового мічення.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Реактиви та обладнання

При проведенні досліджень використовували наступний перелік реактивів: середовище «IMDM» («Gibco», США); «FBS» (fetal bovine serum, фетальна бича сироватка) («Gibco», США); «Trypsin-EDTA» («Gibco», США); фосфатно-сольовий буферний розчин «PBS» («Gibco», США); реагент для трансфекції «Lipofectamine 2000» («Life Technologies», США); генетицин «G418» («Sigma-Aldrich», США); «TRI Reagent» («Sigma-Aldrich», США); хлороформ («Sigma-Aldrich», США); ізопропанол («Sigma-Aldrich», США); етанол («Sigma-Aldrich», США); набір для синтезу кДНК «RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit» («Thermo Fisher Scientific», США); флуоресцентний барвник «EvaGreen» («Bio-Rad», США); суміш праймерів «MRPS18-2» («Sigma-Aldrich», США); розчин гематоксиліну Майєра («Sigma-Aldrich», США); розчин еозину Y («Sigma-Aldrich», США); парафін для гістологічних заливок («Leica Biosystems», Німеччина); 10 % нейтральний забуферений формалін («Sigma-Aldrich», США).

У роботі було використано наступне обладнання: термостат «ТС 80М» («Ukrmedprom», Україна); лабораторний шейкер «ІКА» («ІКА», Німеччина); спектрофотометр «NanoDrop ND 1000 UV Vis» («Thermo Fisher Scientific», США); центрифуга «Sigma 2 16KL» («Sigma Laborzentrifugen», Німеччина); камера для горизонтального електрофорезу «Bio Rad» («Bio Rad», США); ламінарний бокс «HERAsafe» («Thermo Fisher Scientific», США); CO₂-інкубатор «Thermo Scientific 3579» («Thermo Fisher Scientific», США); ампліфікатор «QuantStudio 5 Real Time» («Thermo Fisher Scientific», США); холодильник «Liebherr» («Liebherr», Німеччина); автоклав «ГК 20»

(«МІЗ-МА», Україна); дозатори та мікропіпетки («Eppendorf», Німеччина); світловий мікроскоп «Leica» («Leica Microsystems GmbH», Німеччина).

2.2. Трансформація клітин *Escherichia coli*

Трансформація являє собою введення екзогенної ДНК у бактеріальну клітину з метою її реплікації та експресії. Оскільки для трансфекції клітин потрібна достатня кількість плазмідної ДНК, її напруцювання здійснювали шляхом трансформації штаму *E. coli* TOP-10.

Підготовку компетентних клітин проводили з використанням хлориду кальцію. Бактерії культивували в середовищі LB (Lysogeny Broth, лізогенне середовище) при 37°C до досягнення OD₆₀₀ у діапазоні 0,4-0,6, після чого осаджували центрифугуванням. Клітинний осад ресуспендували у 0,1 М розчині CaCl₂ та витримували на льоду 30 хв. Після повторного центрифугування клітини ресуспендували у CaCl₂ з 15 % гліцерину, розливали на аліквоти та зберігали при -80°C до використання.

Власне трансформацію проводили методом теплового шоку. Аліквоти компетентних клітин розморожували на льоду, змішували з 5 мкл плазмідної ДНК та витримували 30 хв при 0°C. Тепловий шок здійснювали при 42°C протягом 42 с з наступним охолодженням на льоду впродовж 2 хв. До клітин додавали 500 мкл культурального середовища S.O.C. та інкубували при 37°C і 200 об/хв протягом 2 год. Отриману суспензію висівали на чашки Петрі з LB-агаром та канаміцином [33].

2.3. Виділення плазмідної ДНК

Після трансформації найбільші колонії відбирали та нарощували в рідкому середовищі LB з антибіотиком. Для екстракції плазмідної ДНК

застосовували набір «PureLink™ HiPure Plasmid DNA Kit» («Thermo Fisher Scientific», США), принцип роботи якого базується на іонообмінній хроматографії. Клітини осаджували, ресуспендували в буферному розчині «R3» з РНКазою А та лізували буферним розчином «L7». Для нейтралізації лізату додавали буферний розчин «N3», надосадову рідину наносили на колонку, промивали буферним розчином «W8», а ДНК елюювали буферним розчином «E4». Елюат осаджували ізопропанолом та розчиняли в ТЕ-буферному розчині, що містить Трис (трис(гідроксиметил)амінометан) та ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота).

Чистоту та концентрацію виділеної ДНК оцінювали спектрофотометрично та шляхом електрофорезу в агарозному гелі [34].

2.4. Культивування клітин

У даному дослідженні було використано клітини лінії остеосаркоми людини Saos-2, отримані з біобанку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Культивування клітин проводилось у середовищі IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium), яке містило 10 % FBS, 2 мМ L-глутаміну, 1 мМ пірувату натрію, амінокислоти, пеніцилін (100 од./мл) та стрептоміцин (100 мкг/мл). Умови культивування підтримувались при температурі 37°C в атмосфері з 5 % вуглекислого газу (CO₂), що є оптимальним для росту та поділу клітин цієї лінії. Середовище замінювали кожні 3-4 дні.

Оскільки клітини Saos-2 є адгезивною культурою, пасажування здійснювали за допомогою розчину трипсину-ЕДТА після попереднього промивання у PBS (Phosphate Buffered Saline, фосфатно-сольовий буферний розчин). Частина клітин використовували для експериментів, решту

заморожували у FBS з 10 % DMSO (диметилсульфоксид) для подальшого зберігання [35].

2.5. Трансфекція клітин лінії Saos-2 та отримання стабільної сублінії

Для трансфекції використано конструкт GFP-MRPS18-2 на основі вектора pCMV-GFP. Злитий білок GFP-S18-2 поєднує цільовий протеїн із зеленим флуоресцентним білком, що дає можливість візуально контролювати його наявність у клітині без додаткових процедур мічення. Плазмідну ДНК конструкту попередньо напруцьовували шляхом трансформації компетентних клітин *E. coli* TOP-10 методом теплового шоку та подальшої екстракції набором «PureLink™ HiPure Plasmid DNA Kit». Чистоту та концентрацію ДНК перевіряли спектрофотометрично на «NanoDrop»; для трансфекції використовували лише зразки з достатньою чистотою (співвідношення A260/A280 в межах 1,8-2,0).

Для трансфекції клітин Saos-2 використовували ліпофектамін 2000, який формує ліпідні комплекси з ДНК. Клітини у логарифмічній фазі росту висівали на 6-лунковий планшет; через 24 год середовище замінювали на свіже. Паралельно готували суміш із 200 мкл безсироваткового середовища, 12 мкл ліпофектаміну та 5 мкл плазміди, яку витримували 10-15 хв за кімнатної температури, після чого вносили по 105 мкл до кожної лунки. Через 4 год інкубації середовище замінювали на поживне з 20 % FBS і культивували клітини ще 48 год.

Для відбору стабільних трансфектантів до клітин додавали поживне середовище з 10 % FBS та селективний антибіотик G418 у концентрації 0,5 мг/мл. Принцип селекції базується на тому, що вектор pGLV3 містить ген резистентності до G418: клітини, в яких конструкт інтегрувався в геном, здатні рости в присутності антибіотика, тоді як нетрансфіковані клітини поступово гинуть. Селекцію проводили протягом приблизно трьох тижнів, після чого з

чашок Петрі відбирали від 18 до 50 одиничних клонів, які висаджували у шестилункові планшети. Клони з найвищою швидкістю росту пересаджували у культуральні флакони об'ємом 50 мл для подальшого накопичення клітинної маси. Отриману сублінію надалі позначено як Saos-2-MRPS18-2 [36].

2.6. Виділення РНК

Виділення РНК проводили з клітинного осаду за допомогою реагенту «TRI Reagent» («Molecular Research Center, Inc.», США). Середовище з клітинами збирали в епендорфи та осаджували центрифугуванням при 1500 об/хв протягом 5 хв. Отриманий осад промивали розчином PBS та повторно центрифугували за тих самих умов. До осаду додавали 500 мкл «TRI Reagent», ресуспендували та витримували в холодильнику 10 хв. Після цього вносили 300 мкл хлороформу, перемішували на вортексі та центрифугували при 12000 об/хв протягом 20 хв. Водну фракцію, що утворилась у верхньому шарі, акуратно переносили в чистий епендорф, додавали ізопропанол в об'ємі 1/3 від об'єму зібраної фракції та залишали на 30 хв у морозильній камері для преципітації РНК. Після інкубації зразки центрифугували при 12000 об/хв протягом 20 хв.

Отриманий осад двічі відмивали 96 % етанолом з наступним центрифугуванням при 12000 об/хв протягом 15 хв. Після висушування осад ресуспендували в 20 мкл dH₂O. З метою запобігання контамінації геномною ДНК до зразків додавали 1 мкл ДНКаз та інкубували 1 год при 37°C.

Концентрацію та чистоту виділеної РНК визначали спектрофотометрично [37].

2.7. Синтез кДНК на матриці РНК

Синтез кДНК здійснювали за допомогою набору «RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit» відповідно до протоколу виробника. Матрицею для реакції слугувала мРНК, отримана на попередньому етапі виділення. Реакція проходила у два кроки. Спочатку в стерильну пробірку вносили 5 мкг РНК та олігонуклеотидний праймер Oligo(dT)18 з концентрацією 100 мкМ, доводячи об'єм суміші до 12 мкл стерильною dH₂O. Пробірку інкубували в ампліфікаторі при 75°C впродовж 5 хв для руйнування вторинних структур РНК та інактивації ДНКаз, після чого охолоджували. До охолодженої суміші додавали 5× реакційний буферний розчин, РНКазний інгібітор «RiboLock RNase Inhibitor», «dNTP Mix» та зворотну транскриптазу «RevertAid M-MuLV», довівши загальний об'єм до 20 мкл. Синтез кДНК тривав 60 хв при 42°C, після чого реакцію зупиняли інкубацією при 70°C протягом 5 хв для інактивації ревертази. Отриману кДНК зберігали при -20°C або -70°C. Для контролю якості синтезу паралельно ставили негативний контроль без зворотної транскриптази (RT-) та позитивний контроль із мРНК гена *GAPDH* (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа). Синтезовану кДНК використовували як матрицю для подальшого проведення кількісної ПЛР [38].

2.8. ПЛР у реальному часі

Для оцінки рівня експресії генів у трансфікованих клітинах використовували метод ПЛР у режимі реального часу. На відміну від класичної ПЛР, цей метод дозволяє кількісно визначити вміст ДНК фрагментів у зразку, використовуючи флуоресцентні барвники, зокрема комерційно доступний «EvaGreen». Інтенсивність флуоресцентного сигналу корелює з накопиченням ампліфікованих фрагментів і відображається у

вигляді кривої з експоненційною фазою, що дозволяє ідентифікувати специфічні продукти реакції за температурою плавлення.

Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила 1 мкл специфічного праймера, 4 мкл барвника «EvaGreen», 2 мкл розчину кДНК та 13 мкл стерильною dH₂O. Реакцію проводили на ампліфікаторі «QuantStudio 5 Real-Time» («Thermo Fisher Scientific») за таким протоколом: початкова денатурація – 10 хв при 95°C, далі 40 циклів: денатурація – 10 с при 95°C та відпал/елонгація – 1 хв при 63°C.

Як ендogenous контроль для нормалізації використовували ген *TBP* – загальний фактор транскрипції, що специфічно зв'язується з ТАТА box. Реакції виконували у трьох біологічних повторах для кожного гена. Для розрахунку рівня експресії застосовували порівняльний метод $\Delta\Delta C_t$, де зміна експресії визначається за формулами (2.1 та 2.2):

$$\text{Відносна експресія} = 2^{-\Delta\Delta C_t}, \quad (2.1)$$

де ΔC_t – різниця між значенням C_t досліджуваного гена та гена ендogenous контролю.

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{трансфікованих клітин}) - \Delta C_t (\text{контрольних}), \quad (2.2)$$

де $\Delta\Delta C_t$ – різниця між значенням C_t трансфікованих і контрольних клітин.

Результати обробляли в програмі «Excel» і представляли у графічному вигляді [39].

2.9. Аналіз туморогенності клітин *in vivo*, на моделі мишей SCID

Для оцінки туморогенного потенціалу отриманої сублінії використовували модель підшкірної ксенотрансплантації клітин імунодефіцитним мишам лінії SCID. Миші цієї лінії позбавлені функціональних Т- і В-лімфоцитів, через що їхня імунна система не здатна розпізнати та знищити чужорідні клітини. Ця особливість робить SCID-мишей класичною моделлю для оцінки туморогенності клітинних ліній людського походження, адже якщо клітини здатні утворити пухлину, вони зроблять це саме в організмі, де імунний бар'єр відсутній.

Клітини первинної лінії Saos-2 та сублінії Saos-2-*MRPS18-2* у логарифмічній фазі росту знімали з поверхні культурального посуду обробкою трипсином-ЕДТА, ресуспендували у стерильному PBS і доводили концентрацію до 4×10^6 клітин на точку ін'єкції [41]. Суспензію вводили мишам підшкірно. Щоб скоротити кількість експериментальних тварин, кожній миші вводили ту саму клітинну лінію у два місця – ліве та праве стегно. Для кожної лінії використовували по дві миші, що забезпечувало по чотири експериментальні точки на лінію. Як первинну лінію Saos-2, так і сублінію Saos-2-*MRPS18-2* вводили за однакових умов.

Наявність і розмір пухлин оцінювали пальпацією через день. Експеримент припиняли, коли розмір пухлини досягав максимально допустимого значення, встановленого дозволом з етики роботи з лабораторними тваринами. Після евтаназії тварин пухлини видаляли та фіксували у 10 % нейтральному забуференому формаліні для подальшого гістологічного аналізу.

Усі експерименти на тваринах проводили відповідно до етичного дозволу, наданого Інститутом експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, а також згідно з чинними рекомендаціями щодо гуманного поводження з лабораторними тваринами.

2.10. Гістологічне забарвлення гематоксиліном та еозином

Для попередньої оцінки морфологічних характеристик сформованих експериментальних пухлин використовували класичне гістологічне забарвлення гематоксиліном та еозином (H&E). Метод базується на здатності базofilного барвника гематоксиліну забарвлювати ядра клітин у синьо-фіолетовий колір, а ацидофiльного еозину – забарвлювати цитоплазму та позаклітинний матрикс у рожевий колір, що дає змогу візуалізувати загальну архітектуру тканини.

Попередньо зафіксовані у 10 % формаліні зразки пухлин зневоднювали в етанолах зростаючої концентрації, просвітлювали у ксилолі та заливали у парафін. На ротаційному мікротомі виготовляли зрізи товщиною 4-5 мкм, які поміщали на предметні скельця.

Безпосередньо перед забарвленням зрізи депарафiнували у ксилолі та повторно гідратували шляхом поетапного промивання в етанолі спадаючої концентрації (99 %, 90 %, 70 % та 30 %) у PBS. Для зниження неспецифічного фону зрізи обробляли 2 % розчином H_2O_2 в метанолі при кімнатній температурі протягом 30 хв. Забарвлення проводили послідовно. Спочатку розчином гематоксиліну, потім розчином еозину з наступним зневодненням і укладанням під покривне скельце. Аналіз забарвлених препаратів здійснювали за допомогою світлового мікроскопа «Leica» при збільшенні $\times 400$. Репрезентативні поля документували у цифровому форматі [40].

2.11. Статистична обробка результатів

Дані кількісної ПЛР представлено як середнє значення $\pm$ стандартна похибка середнього (SEM) для трьох біологічних повторів ($M \pm m$). Статистичну значущість різниць між двома групами оцінювали за допомогою

t-критерію Стюдента для незалежних вибірок з використанням програми «Microsoft Excel» (функція «T.TEST»).

Рівні значущості позначені як ** ($p < 0,01$) та *** ($p < 0,001$).

Результати експерименту на SCID-мишах мають бінарний характер (формування пухлини / відсутність пухлини) і представлені описово.

Для візуалізації результатів використовували програму «Microsoft Excel».

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Отримання сублінії Saos-2 зі стабільною надекспресією MRPS18-2

Щоб дослідити вплив надекспресії MRPS18-2 на проліферацію клітин остеосаркоми, було створено стабільну сублінію на основі лінії Saos-2. Її обрано, оскільки, Saos-2 є усталеною клітинною моделлю остеосаркоми і водночас повністю позбавлена функціонального білка RB. Завдяки цьому можна дослідити дію MRPS18-2 у системі, де його основна описана мішень відсутня.

Як було зазначено раніше, основний відомий механізм дії MRPS18-2 полягає у зв'язуванні з pocket-доменом RB та витісненні транскрипційного фактора E2F1, що стимулює вхід клітини в S-фазу [3, 4, 7]. У попередніх дослідженнях цей механізм вивчався переважно на клітинах з інтактним RB – первинних ембріональних фібробластах щура [5] та миші [6]. Там надекспресія S18-2 призводила до іморталізації, набуття маркерів стовбуровості (SOX2, OCT4, KLF4) і навіть злоякісної трансформації з хромосомною нестабільністю [5, 6]. Проте залишається невідомим, чи зберігає MRPS18-2 свій онкогенний потенціал у клітинах, де RB відсутній. Саме для відповіді на це питання і було обрано лінію Saos-2.

Крім того, Saos-2 зберігає високу активність лужної фосфатази, яка є маркером клітин кісткової тканини [32], що підтверджує релевантність цієї моделі саме для дослідження остеосаркоми. Ця лінія добре охарактеризована в літературі: при ектопічній експресії будь-якого з pocket-білків (RB1, p107 або p130) у Saos-2 спостерігається відтворювана зупинка клітинного циклу та репресія E2F-залежних генів [26], що підтверджує функціональність цієї системи для досліджень, пов'язаних зі шляхом RB-E2F1.

Колонії відсаджували у шестилункові планшети для індивідуального нарощування. Клони, що демонстрували найвищу швидкість росту, пересаджували у культуральні флакони для накопичення клітинної маси. Отриману сублінію далі у роботі позначено як Saos-2-*MRPS18-2* (рис 3.1).

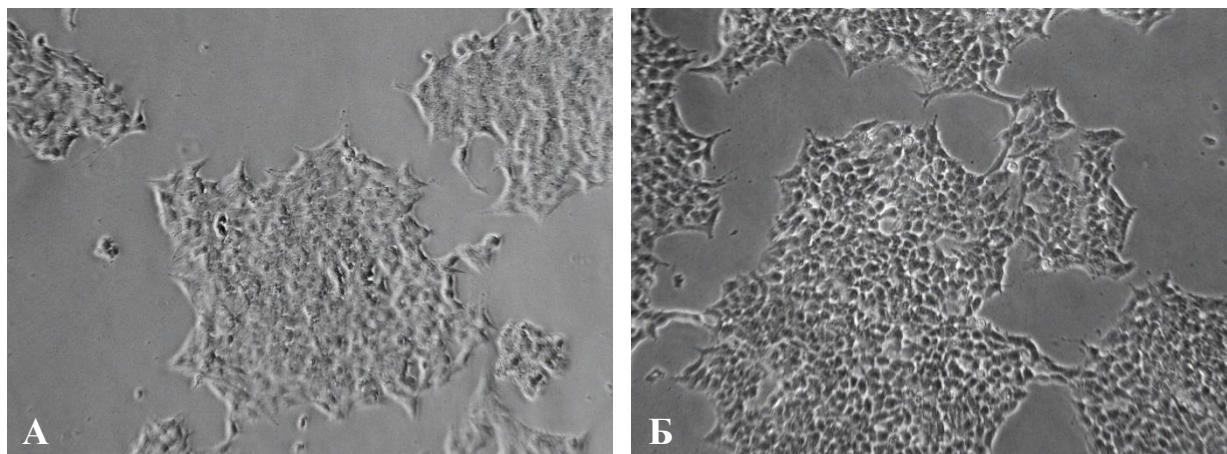


Рис. 3.1. Мікрофотографія клітин лінії Saos-2 остеосаркоми (А) та клітин отриманої стабільної сублінії Saos-2-*MRPS18-2* (Б) (збільшення $\times 100$)

3.2. Аналіз рівня експресії генів *MRPS18-1*, *MRPS18-2* та *C-MYC* у сублінії Saos-2-*MRPS18-2*

Після отримання стабільної сублінії необхідно було переконатися, що вона дійсно несе підвищений рівень мРНК цільового гена. Для цього проведено кількісну ПЛР у режимі реального часу з ендogenous контролем. Окрім *MRPS18-2*, аналізували ще два гени. *MRPS18-1* обрано як контроль специфічності – він є найближчим гомологом *MRPS18-2* і входить до тієї ж субодиниці мітохондріальної рибосоми [2], тому важливо було перевірити, що конструкт не впливає на його експресію. *C-MYC* аналізували, оскільки описано його зв'язок рівнем *MRPS18-2* у стовбурових клітинах [6].

Як видно з рис. 3.2, рівень мРНК *MRPS18-2* у сублінії виявився у 2,5 раза вищим порівняно з первинною лінією ($14,50 \pm 0,12$ проти $5,80 \pm 0,12$;

$p < 0,001$). Це означає, що конструкт GFP-*MRPS18-2* стабільно інтегрувався в геном клітин і забезпечував транскрипцію цільового гена.

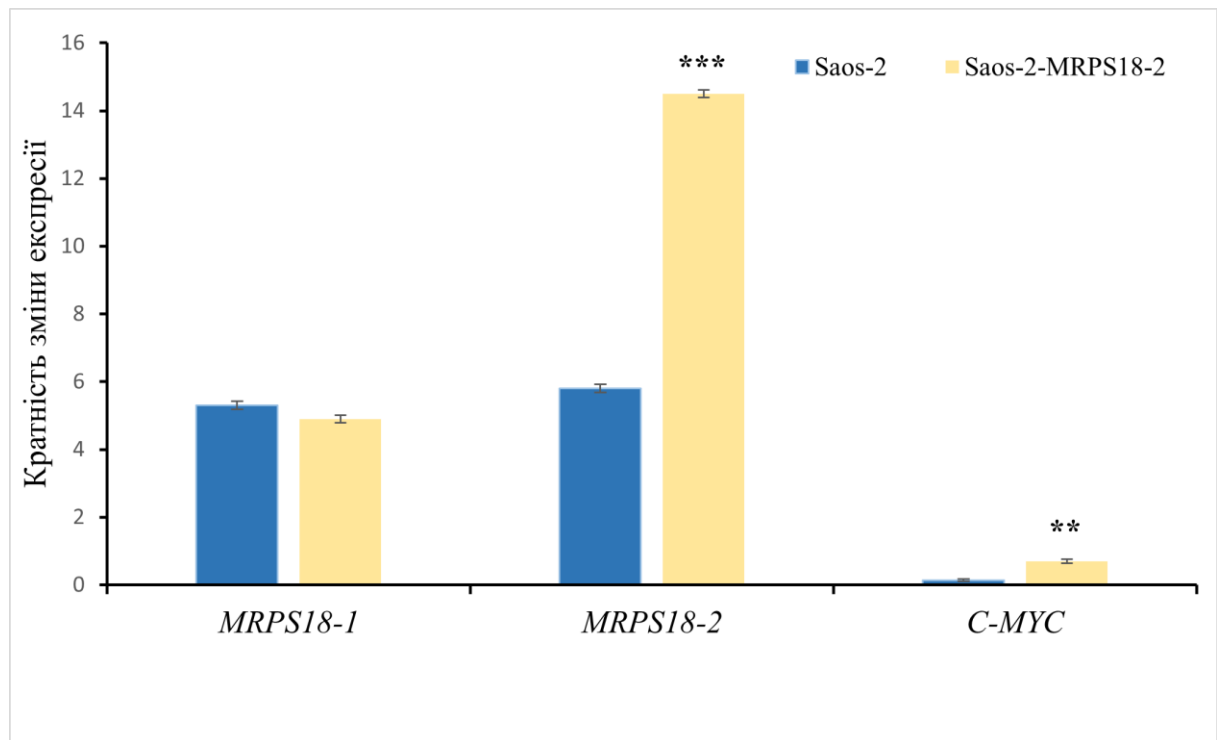


Рис. 3.2. Рівень експресії генів *MRPS18-1*, *MRPS18-2* та *C-MYC* у клітинах Saos-2 та Saos-2-*MRPS18-2* ($M \pm m$; $n = 3$)

** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ порівняно з Saos-2

При цьому рівень мРНК *MRPS18-1* практично не змінився між двома лініями ($5,30 \pm 0,12$ проти $4,90 \pm 0,12$; $p = 0,07$). Різниця не досягає порогу статистичної значущості.

Цей результат був важливим, оскільки *MRPS18-1* і *MRPS18-2* є доволі близькими білками. Вони обидва входять до малої субодиниці (28S) мітохондріальної рибосоми і мають спільне еволюційне походження. Якщо б трансфекція конструктом *MRPS18-2* паралельно змінила експресію *MRPS18-1*, це могло б означати, що ми спостерігаємо неспецифічний ефект на мітохондріальний апарат, а не цілеспрямовану дію нашого конструкту. Оскільки *MRPS18-1* залишився без змін, можна говорити про специфічність експресії.

Що стосується *C-MYC*, то його рівень мРНК у сублінії зріс порівняно з контролем. Але важливо зазначити, що абсолютні значення відносного рівня експресії для *C-MYC* в обох лініях є невисокими, нижчими за одиницю. Це вказує на те, що *C-MYC* загалом транскрибується у клітинах Saos-2 на низькому рівні. Але різниця між лініями статистично значуща і відтворювана.

Цей результат узгоджується з літературними даними. У роботі Mushtaq нокдаун *MRPS18-2* у мезенхімальних стовбурових клітинах людини супроводжувався зниженням рівня *c-MYC* [6]. У нашому дослідженні спостерігається зворотна залежність: надекспресія *MRPS18-2* призводила до зростання рівня мРНК *C-MYC*. Таким чином, рівень експресії *MRPS18-2* та *C-MYC* змінювалися односпрямовано. Враховуючи, що *c-MYC* є відомим регулятором клітинної проліферації, його активація при надекспресії *MRPS18-2* може бути одним із механізмів, через які *MRPS18-2* стимулює поділ клітин. Невідомо, яким саме шляхом *MRPS18-2* впливає на рівень *C-MYC*. Відомо, що *MRPS18-2* здатний формувати комплекс із прогібітином 2 (PHB2) та убіквітин-Е3-лігазою RNF2. Цей комплекс підсилює моноубіквітинування гістону H2A, що впливає на те, які гени транскрибуються, а які ні [6]. Можна припустити, що зміни у модифікаціях гістонів при надекспресії *MRPS18-2* певним чином впливають на ділянку гена *C-MYC*, але для підтвердження цього потрібні додаткові дослідження.

Отже, можна зробити висновок, що створена сублінія дійсно несе стабільну надекспресію *MRPS18-2*, а надекспресія *MRPS18-2* супроводжується зростанням рівня *C-MYC*.

3.3. Аналіз туморогенності клітин Saos-2 та Saos-2-*MRPS18-2* на моделі мишей SCID

Після підтвердження надекспресії на рівні мРНК наступним кроком було з'ясувати, чи має ця надекспресія функціональні наслідки – а саме, чи впливає

вона на здатність клітин формувати пухлини в живому організмі. Для цього проведено експеримент із підшкірною інокуляцією клітин мишам лінії SCID.

У мишей, яким вводили первинну лінію Saos-2, пухлини не сформувалися в жодній із чотирьох точок. Цей результат не є несподіваним. Клітини Saos-2 і раніше показували обмежену здатність до приживлення при стандартній підшкірній ксенотрансплантації без додаткових факторів, таких як «Матригель» («Matrigel», желатиноподібний білковий екстракт, що імітує природну позаклітинну матрицю). Це пов'язано не з тим, що клітини «недостатньо злоякісні», а скоріше з тим, що для успішного приживлення підшкірно потрібні певні сигнали мікрооточення, яких клітини Saos-2 самотійно забезпечити не можуть.

Натомість, у точках ін'єкції сублінії Saos-2-MRPS18-2 спостерігалось формування пухлин. Пухлини прогресивно нарощували об'єм протягом усього періоду спостереження. Динаміку росту трьох пухлин, відстежених впродовж експерименту, наведено на рис. 3.3.

Як видно з рис. 3.3, протягом першого тижня після інокуляції пухлини не визначалися пальпаторно – цей період відповідає латентній фазі, необхідній для приживлення клітин та початку їх активного поділу в тканинах тварини. Після цього всі три пухлини почали рости. Швидкість росту дещо відрізнялася між окремими точками, що є типовим для подібних експериментів – навіть у межах однієї клітинної лінії кожна окрема пухлина росте з індивідуальною динамікою, залежно від локальних умов приживлення. Проте загальна тенденція прогресивного нарощення об'єму відтворюється для кожної з трьох пухлин.

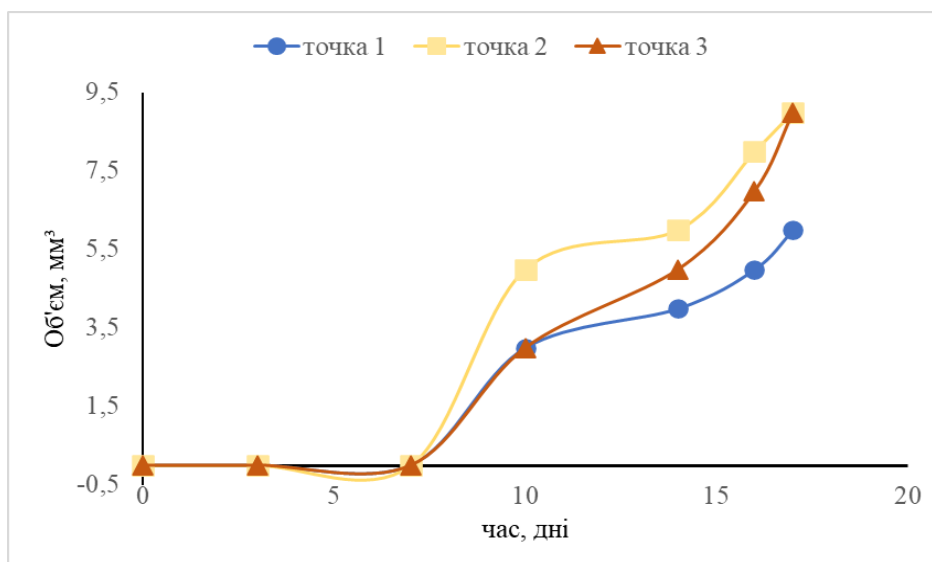


Рис. 3.3. Криві динаміки росту експериментальних пухлин, утворених клітинами сублінії Saos-2-MRPS18-2 у мишей лінії SCID (тяжкий комбінований імунodefіцит). На осі абсцис – час від моменту підшкірної ін'єкції, на осі ординат – об'єм пухлини. Криві 1, 2 і 3 відповідають трьом окремим точкам ін'єкції

Цей результат означає, що надекспресія *MRPS18-2* наділила нетуморогенні клітини Saos-2 здатністю не лише приживатися в тканинах тварини, а й активно рости *in vivo*, формуючи макроскопічні пухлини. Іншими словами, *MRPS18-2* діє як онкопротеїн.

Основний відомий механізм дії *MRPS18-2* полягає у зв'язуванні з pocket-доменом білка RB та витісненні звідти транскрипційного фактора E2F1. Вивільнений E2F1 активує гени, необхідні для входу клітини в S-фазу, тобто стимулює поділ. Проте клітини Saos-2 не містять функціонального RB. Отже, цей механізм у нашій системі працювати не може.

Тим не менше, пухлини утворюються. Це означає, що *MRPS18-2* має додаткові, RB-незалежні шляхи впливу на клітинну поведінку. Цей висновок не суперечить попереднім дослідженням, а доповнює їх. У роботі Darekar надекспресія *MRPS18-2* у первинних фібробластах шкіри щура спричиняла злоякісну трансформацію з хромосомною нестабільністю [5].

Але ті клітини мали інтактний RB, тому там класичний механізм (витіснення E2F1) міг працювати. Було описано каскад подій, що починається саме з порушення комплексу RB-E2F1. У нашому випадку ситуація інша: Saos-2 від початку не мають RB, тому перший крок цього каскаду неможливий. Але кінцевий результат набуття туморогенності спостерігається і в нашій моделі. Це вказує на те, що механізм дії MRPS18-2 є ширшим, ніж вважалось раніше.

Одним з RB-незалежних механізмів може бути епігенетична регуляція. Як вже згадувалось, S18-2 здатний формувати комплекс із прогібітином 2 та убіквітин-E3-лігазою RNF2. Цей комплекс підсилює моноубіквітінування гістону H2A, що пригнічує транскрипцію генів диференціації [6]. Якщо в клітинах Saos-2-MRPS18-2 ці гени пригнічені, клітини залишаються у незрілому, більш проліферативному стані, що може сприяти формуванню пухлин.

Інший можливий механізм пов'язаний з активацією C-MYC. Як показано в підрозділі 3.2, надекспресія S18-2 супроводжувалась підвищенням рівня мРНК C-MYC. Білок c-MYC є потужним стимулятором клітинного поділу і відомим онкогеном, гіперактивація якого описана при багатьох типах пухлин. Навіть помірне підвищення його рівня може вносити внесок у набуття туморогенного фенотипу. Ці два механізми не виключають один одного і можуть діяти паралельно.

Отримані результати мають і практичне значення. Остеосаркома залишається однією з пухлин, для яких терапевтичні підходи суттєво не змінювалися впродовж останніх десятиліть. П'ятирічна виживаність при локалізованих формах складає 60-70 %, але при метастатичному ураженні цей показник падає до 20-30 % [13, 14], і ця цифра практично не покращилась з часу впровадження комбінованої хіміотерапії у 1970-х роках [15].

Пошук нових молекулярних мішеней є одним із актуальних напрямків у цій галузі. Якщо MRPS18-2 здатний наділяти туморогенністю клітини остеосаркоми навіть без функціонального RB, це означає, що він може бути

мішенню для розробки нових терапевтичних підходів незалежно від статусу RB у конкретного пацієнта.

3.4. Гістологічний аналіз експериментальних пухлин

Репрезентативні поля двох експериментальних пухлин, утворених клітинами сублінії Saos-2-*MRPS18-2*, наведено на рис. 3.4.

На препаратах видно пухлинну тканину зі щільним клітинним складом. Морфологічна картина помітно гетерогенна: ділянки з переважанням округлих базofilічних клітин у щільних скупченнях чергуються з полями веретеноподібних клітин, занурених у помірно виражений позаклітинний матрикс. Така гетерогенність в цілому характерна для злоякісних новоутворень.

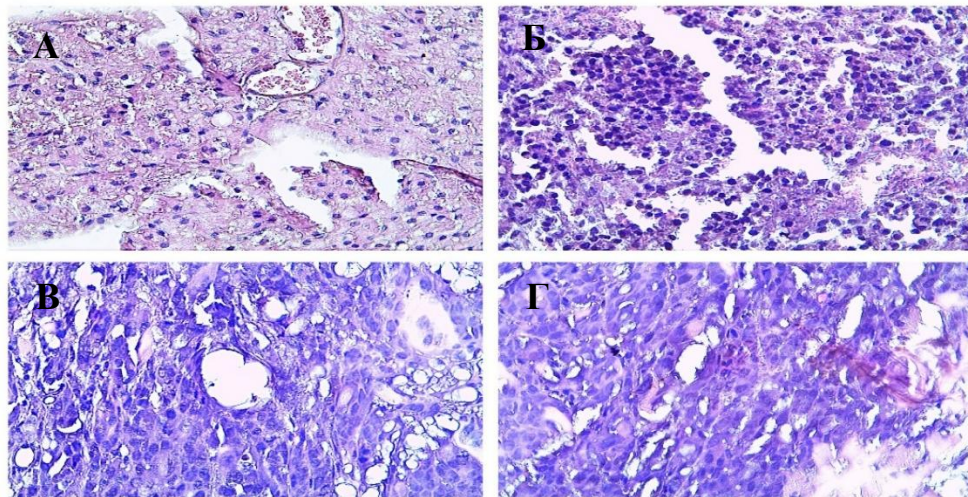


Рис. 3.4. Гістологічні зрізи експериментальних пухлин, утворених клітинами сублінії Saos-2-*MRPS18-2* у мишей лінії SCID. Зрізи двох різних пухлин: пухлина 1 (А, Б) та пухлина 2 (В, Г); для кожної пухлини наведено два різні поля зору (забарвлення гематоксиліном та еозином; збільшення $\times 400$)

Наявність ділянок з різним типом клітин – від округлих базофільних до веретеноподібних – може відображати здатність трансформованих клітин до часткової диференціації.

Паралель простежується з даними Mushtaq [6], де клітини RH18RB (фібробласти миші з надекспресією *MRPS18-2* та *RB*) зберігали здатність до мультилінійної диференціації: остеогенної, хондрогенної та адипогенної. Безумовно, модель RH18RB суттєво відрізняється від нашої (інший тип клітин, наявність *RB*), тому прямо переносити ці дані не можна. Проте сам факт морфологічної гетерогенності свідчить, що вплив *MRPS18-2* на клітини не обмежується стимуляцією проліферації.

Сукупність отриманих даних підтверджує, що *MRPS18-2* зберігає онкогенний потенціал навіть у клітинах, позбавлених функціонального *RB*. Надекспресія злитого протеїну GFP-*MRPS18-2* у лінії Saos-2 супроводжувалася підвищенням рівня мРНК *C-MYC* і, що принципово важливо, набуттям здатності до туморогенезу *in vivo*. Оскільки класичний *RB*-залежний механізм у цій системі виключений, отриманий ефект може пояснюватись епігенетичною регуляцією через комплекс *MRPS18-2/PHB2/RNF2* та активацією *C-MYC*. Морфологічна гетерогенність пухлин додатково вказує на те, що вплив *MRPS18-2* не обмежується стимуляцією проліферації, а зачіпає й процеси диференціації клітин. Отримані результати мають потенційне практичне значення. Остеосаркома залишається пухлиною з обмеженими терапевтичними можливостями, оскільки п'ятирічна виживаність при метастатичних формах не перевищує 20-30 %, і цей показник не покращувався впродовж останніх десятиліть. Виявлення *RB*-незалежної онкогенної активності *MRPS18-2* відкриває перспективу розгляду цього білка як потенційної мішені для розробки нових підходів до терапії остеосаркоми. Подальша робота передбачає імуногістохімічний аналіз пухлин з маркерами остеогенної диференціації (*RUNX2*, остеокальцин, лужна фосфатаза) для точнішої характеристики клітинного фенотипу, детальну гістопатологічну

класифікацію сформованих пухлин та з'ясування молекулярних механізмів RB-незалежної онкогенної активності MRPS18-2.

Отже, наукова новизна роботи полягає в тому, що вперше досліджено вплив надекспресії MRPS18-2 на проліферацію клітин Saos-2. Специфікою цієї моделі є відсутність функціонального RB – основної мішені MRPS18-2 відомого механізму регуляції клітинного циклу. Отримані результати дозволяють з'ясувати онкогенний потенціал MRPS18-2 та здатність цього білка впливати на проліферацію клітин остеосаркоми незалежно від взаємодії з RB. Результати роботи поглиблюють розуміння молекулярних механізмів проліферації клітин остеосаркоми і можуть бути корисними при розробці нових підходів до таргетної терапії раку.

ВИСНОВКИ

У роботі проаналізовано проліферацію клітин лінії Saos-2 остеосаркоми за дії злитого протеїну GFP-MRPS18-2 та встановлено здатність MRPS18-2 індукувати канцерогенез незалежно від статусу білка RB.

1. Отримано стабільну сублінію Saos-2 з надекспресією MRPS18-2 шляхом трансфекції плазмідним конструктом GFP-MRPS18-2.

2. Виявлено 2,5-кратне підвищення рівня мРНК *MRPS18-2* в сублінії Saos-2-*MRPS18-2* при незмінному рівні мРНК його паралога *MRPS18-1*, на тлі підвищення рівня мРНК *C-MYC* в 5,3 раза.

3. Показано, що на моделі імунодефіцитних мишей лінії SCID (тяжкий комбінований імунодефіцит) сублінія Saos-2-*MRPS18-2* формувала пухлини при підшкірній інокуляції, натомість первинна лінія Saos-2 за тих самих умов пухлин не утворювала, що свідчить про RB-незалежну онкогенну активність MRPS18-2.

4. Виявлено щільну клітинну будову та морфологічну гетерогенність сформованих експериментальних пухлин: із чергуванням ділянок округлих базофільних і веретеноподібних клітин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Diller, L., Kassel, J., Nelson, C.E., Gryka, M.A., Litwak, G., Gebhardt, M., Bressac, B., Ozturk, M., Baker, S.J., Vogelstein, B. and Friend, S.H. (1990). p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Molecular and Cellular Biology*, 10(11), pp. 5772–5781.
2. Mushtaq, M., Ali, R.H., Kashuba, V., Klein, G. and Kashuba, E. (2016). S-18 family of mitochondrial ribosomal proteins: evolutionary history and Gly132 polymorphism in colon carcinoma. *Oncotarget*, 7(34), pp. 55649–55662.
3. Kashuba, E., Yurchenko, M., Yenamandra, S.P., Snopok, B., Isaguliants, M., Szekely, L. and Klein, G. (2008). EBV-encoded EBNA-6 binds and targets MRPS18-2 to the nucleus, resulting in the disruption of pRb-E2F1 complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105(14), pp. 5489–5494.
4. Кашуба, О.В. та Ковалевська, Л.М. (2021). Функціональні наслідки взаємодії протеїнів MRPS18-2 та RB при трансформації клітини. *Онкологія*, [online] Том 23(1-2). Available at: <https://doi.org/10.32471/oncology.2663-7928.t-23-1-2021-g.9384> [Accessed 15 February 2026].
5. Darekar, S.D., Mushtaq, M., Gurrupu, S., Kovalevska, L., Drummond, C., Petruczek, M., Tirinato, L., Di Fabrizio, E., Carbone, E. and Kashuba, E. (2015). Mitochondrial ribosomal protein S18-2 evokes chromosomal instability and transforms primary rat skin fibroblasts. *Oncotarget*, 6(25), pp. 21016–21028.
6. Mushtaq, M., Kovalevska, L., Darekar, S., Abramsson, A., Zetterberg, H., Kashuba, V., Klein, G., Arsenian-Henriksson, M. and Kashuba, E. (2020). Cell stemness is maintained upon concurrent expression of RB and the mitochondrial ribosomal protein S18-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 117(27), pp. 15673–15683.
7. Ковалевська, Л.М. та Кашуба, О.В. (2021). Роль протеїнів родини MRPS18 у злоякісній трансформації клітини. В: *Шляхи та перспективи*

розвитку експериментальної онкології в Україні. В. Ф. Чехун, ред. Київ: «ДІА», pp. 77–90.

8. Kashuba, E.V. and Mushtaq, M. (2017). Do MRPS18-2 and RB proteins cooperate to control cell stemness and differentiation, preventing cancer development? *Experimental Oncology*, 39(1), pp. 12–16.
9. Drezner, N.L. and Packer, R.J. (2016). The impact of molecular analysis on the survival of children with embryonal tumors. *Translational Pediatrics*, 5(1), pp. 5–8.
10. Tulla, M., Berthold, F., Graf, N., Rutkowski, S., von Schweinitz, D., Spix, C. and Kaatsch, P. (2015). Incidence, trends, and survival of children with embryonal tumors. *Pediatrics*, 136(3), pp. e623–e632.
11. Louis, D.N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D.J., Cree, I.A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H.K., Pfister, S.M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A. and Ellison, D.W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), pp. 1231–1251.
12. Jamshidi, P. and Brat, D.J. (2022). The 2021 WHO classification of central nervous system tumors: what neurologists need to know. *Current Opinion in Neurology*, 35(6), pp. 764–771.
13. Misaghi, A., Goldin, A., Awad, M. and Kulidjian, A.A. (2018). Osteosarcoma: a comprehensive review. *SICOT-J*, 4, p. 12.
14. Mushtaq, M., Gaza, H.V. and Kashuba, E.V. (2016). Role of the RB-interacting proteins in stem cell biology. *Advances in Cancer Research*, 131, pp. 133–157.
15. Ottaviani, G. and Jaffe, N. (2009). The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treatment and Research*, 152, pp. 3–13.
16. Shoaib, Z., Fan, T.M. and Irudayaraj, J.M.K. (2022). Osteosarcoma mechanobiology and therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology*, 179(2), pp. 201–217.

17. Sun, X. and Wei, G. (2020). Prognostic factors in osteosarcoma: a study level meta-analysis and systematic review of current practice. *Journal of Bone Oncology*, 21, p. 100281.
18. Imbert-Bouteille, M., Gauthier-Villars, M., Leroux, D., Meunier, I., Aerts, I., Lumbroso-Le Rouic, L., Lejeune, S., Delnatte, C., Abadie, C., Pujol, P., Houdayer, C. and Corsini, C. (2019). Osteosarcoma without prior retinoblastoma related to RB1 low-penetrance germline pathogenic variants: a novel type of RB1-related hereditary predisposition syndrome? *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 7(12), p. e913.
19. Broadhead, M.L., Clark, J.C.M., Myers, D.E., Dass, C.R. and Choong, P.F.M. (2011). The molecular pathogenesis of osteosarcoma: a review. *Sarcoma*, 2011, p. 959248.
20. Hinds, P.W. and Ballatori, S.A. (2016). Osteosarcoma: prognosis plateau warrants retinoblastoma pathway targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 1, p. 16001.
21. Vincent, A., Natarajan, V., Khetan, V., Krishnakumar, S. and Parameswaran, S. (2020). Heterozygous retinoblastoma gene mutation compromises in vitro osteogenesis of adipose mesenchymal stem cells – a temporal gene expression study. *Experimental Cell Research*, 396(1), p. 112263.
22. Czarnecka, A.M., Synoradzki, K., Firlej, W., Bartnik, E., Sobczuk, P., Fiedorowicz, M., Grieb, P. and Rutkowski, P. (2020). Molecular biology of osteosarcoma. *Cancers (Basel)*, 12(8), p. 2130.
23. Marchandet, L., Lallier, M., Charrier, C., Baud'huin, M., Ory, B. and Lamoureux, F. (2021). Mechanisms of resistance to conventional therapies for osteosarcoma. *Cancers (Basel)*, 13(4), p. 683.
24. Zhou, L., Ng, D.S.C., Yam, J.C., Chen, L.J., Tham, C.C., Pang, C.P. and Chu, W.K. (2022). Post-translational modifications on the retinoblastoma protein. *Journal of Biomedical Science*, 29(1), p. 33.
25. Hesbacher, S., Pfitzer, L., Wiedorfer, K., Angermeyer, S., Borst, A., Haferkamp, S., Scholz, C.J., Wobser, M., Schrama, D. and Houben, R. (2016). RB1

is the crucial target of the Merkel cell polyomavirus Large T antigen in Merkel cell carcinoma cells. *Oncotarget*, 7(22), pp. 32956–32968.

26. Gbala, I., Kavcic, N. and Banks, L. (2025). The retinoblastoma protein contributes to maintaining the stability of HPV E7 in cervical cancer cells. *Journal of Virology*, 99(4), p. e02203-24.

27. Kast-Woelbern, H., Martinho, S.K., Julio, K.T., Vazzana, A.M., Mandagie, A.E. and Jansma, A.L. (2025). The use of intrinsic disorder and phosphorylation by oncogenic viral proteins to dysregulate the host cell cycle through interaction with pRb. *Viruses*, 17(6), p. 835.

28. Kram, D.E., Henderson, J.J., Baig, M., Chakraborty, D., Gardner, M.A., Biswas, S. and Khatua, S. (2018). Embryonal tumors of the central nervous system in children: the era of targeted therapeutics. *Bioengineering (Basel)*, 5(4), p. 78.

29. Mints, M., Mushtaq, M., Iurchenko, N., Kovalevska, L., Stip, M.C., Budnikova, D., Andersson, S., Polischuk, L., Buchynska, L. and Kashuba, E. (2016). Mitochondrial ribosomal protein S18-2 is highly expressed in endometrial cancers along with free E2F1. *Oncotarget*, 7(16), pp. 22150–22158.

30. Mushtaq, M., Jensen, L., Davidsson, S., Grygoruk, O.V., Andrén, O., Kashuba, V. and Kashuba, E. (2018). The MRPS18-2 protein levels correlate with prostate tumor progression and it induces CXCR4-dependent migration of cancer cells. *Scientific Reports*, 8(1), p. 2268.

31. Chen, Q., Zhang, Y., Lu, J.-J. and Li, T. (2025). Mitochondrial ribosomal protein family in cancers: mechanistic insights and therapeutic implications. *MedComm – Oncology*, 4(2), p. e70024.

32. Murray, E., Provvedini, D., Curran, D., Catherwood, B., Sussman, H. and Manolagas, S. (1987). Characterization of a human osteoblastic osteosarcoma cell line (SAOS-2) with high bone alkaline phosphatase activity. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2(3), pp. 231–238.

33. Green, M.R. and Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
34. *PureLink HiPure Plasmid DNA Kit* (no date) Thermo Fisher Scientific. Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K210002> (Accessed: 20 April 2026).
35. Pautke, C., Schieker, M., Tischer, T., Kolk, A., Neth, P., Mutschler, W. and Milz, S. (2004). Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Research*, 24(6), pp. 3743–3748.
36. *Lipofectamine 2000 Transfection Reagent* (no date) Thermo Fisher Scientific. Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11668019> (Accessed: 20 April 2026).
37. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248–254.
38. *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (no date) Thermo Fisher Scientific. Available at: https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012715_RevertAid_FirstStrand_cDNA_Syn_K1621_UG.pdf (Accessed: 20 April 2026).
39. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25(4), pp. 402–408.
40. Kiernan, J. A. (2015). *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. 5th ed. Banbury: Scion Publishing Ltd.
41. Jung, J., Seol, H. S. and Chang, S. (2018). The Generation and Application of Patient-Derived Xenograft Models for Cancer Research. *Development & Reproduction*, 22(1), pp. 1–10.