

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Біологічний факультет

Кафедра генетики і цитології

До захисту допущено

Кафедрою генетики і цитології протокол № _____ від _____

завідувач кафедри


(підпис)

Наталя ВОЛКОВА

(ім'я, прізвище)

«05» грудня 2025 р.

Кваліфікаційна робота
здобувача другого (магістерського) рівня вищої освіти

**Інтеграція протеомних даних для аналізу ролі RRP1B в
клітинній біології**

(назва роботи)

Спеціальність (спеціалізація) 091 Біологія та біохімія

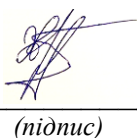
(код та найменування спеціальності; спеціалізації спеціальності - за наявності)

Освітня програма

Генетика

(назва освітньої програми)

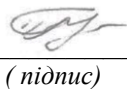
Виконавець


(підпис)

Евеліна БАБЕНКО

(ім'я, прізвище)

Науковий керівник


(підпис)

Наталія БАГАЦЬКА

(ім'я, прізвище)

Науковий консультант

(підпис)

Андрій БУГАЙ

доцент (assistant professor)

Орхуського Університету (Данія)

(ім'я, прізвище)

Харків – 2025

РЕФЕРАТ

Роботу викладено на 100с. друкованого тексту, ілюстровано 7 таблицями, 14 рисунками.

Об'єкт дослідження – Ракова клітинна лінія HeLa.

Предмет дослідження – Функції білка RRP1B (продукту гена *RRP1B*).

Мета дослідження – Дослідити функції білка RRP1B в клітинах людини за допомогою протеомного аналізу білкових взаємодій RRP1B.

Методи – Геномна модифікація за допомогою методу CRISPR-Cas9.

У роботі розроблено нову експериментальну модель дослідження функцій білка RRP1B, який бере участь у регуляції метаболізму РНК у клітинах людини. Модель базується на застосуванні технології CRISPR-Cas9 для створення стабільно модифікованої клітинної лінії, що експресує ектопічно мічену версію білка RRP1B. Це забезпечує можливість подальшого проведення імунопреципітації та протеомного аналізу білкових взаємодій з метою визначення складу білкових комплексів, у які входить RRP1B.

Система також дозволяє використати вектори в ракових клітинах молочної залози й дослідити ген *RRP1B* саме в тих клітинах в майбутньому. Моделі на основі HeLa часто використовують тимчасову або стабільну інтеграцію CDS білка з ектопічною міткою, що дозволяє проводити імунопреципітацію цільового білка та аналіз його взаємодії з ДНК і РНК.

Ключові слова: CRISPR-Cas9, клітинні лінії, ген *RRP1B*, метаболізм нуклеїнових кислот, протеоміка, імунопреципітація.

Використано 51 джерело літератури.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	2
ЗМІСТ.....	3
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СПЕЦІАЛЬНИХ ТЕРМІНІВ.....	6
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. РНК-МЕТАБОЛІЗМ (ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ)	
1.1.РНК-метаболізм у ядрі в здорових та ракових клітинах.....	11
1.1.1. РНК-метаболізм як фундамент клітинної гомеостазі.....	11
1.1.2. Транскрипція РНК-полімеразами II: регуляція в нормі та при онкології.....	11
1.1.3. Сплайсинг пре-мРНК: альтернативний сплайсинг як маркер пухлинного стану.....	13
1.1.4. 3'-кінцевий процесинг і поліаденілювання: контроль стабільності транскриптів.....	14
1.1.5. Ядерний контроль якості РНК: деградація дефектних транскриптів.....	15
1.1.6. Експорт РНК з ядра: баланс між якістю та швидкістю.....	17
1.1.7. Некодуючі ядерні РНК (snRNA, snoRNA, lncRNA): приховані регулятори.....	18
1.1.8. Зв'язок ядерного РНК-метаболізму з клітинним фенотипом і пухлинною прогресією.....	19
1.1.9. Перспективи: націлення на ядерні процеси РНК як	20

терапевтична стратегія.....	
1.2. Сучасні уявлення про ген <i>RRP1B</i>	22
1.2.1. Структура гена <i>RRP1B</i> та білка.....	22
1.2.2. Еволюція гена та білка <i>RRP1B</i>	23
1.2.3. Специфіка <i>RRP1B</i> пов'язана з функціями в нуклеоплазмі....	24
1.3. Ідентифікація гена <i>RRP1B</i> в онкології.....	25
1.3.1. <i>RRP1B</i> як модифікатор метастазування у онкології.....	25
1.4. Протеомний аналіз.....	27
1.4.1. Значення протеомного аналізу в медико-біологічних та онкологічних дослідженнях.....	27
1.4.2. Протеомний аналіз як інструмент для вивчення білкових взаємодій.....	29
1.4.3. Методи протеомного аналізу для дослідження білкових взаємодій.....	30
1.4.4. IP-MS експеримент.....	31
1.4.5. Принципи аналізу даних.....	32
1.4.6. Попередня обробка даних та оцінка результатів.....	34
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	36
2.1. Дизайн дослідження.....	36
2.2. Матеріали експерименту.....	36
2.3. Методи дослідження.....	41
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	53
3.1. Розробка експериментальної моделі для дослідження <i>RRP1B</i> за допомогою CRISPR-Cas9 модифікації гена <i>RRP1B</i>	53
3.1.1. Описання стратегії модифікації гена <i>RRP1B</i> за допомогою CRISPR-Cas9.....	54

3.1.2. Конструювання гРНК та клонування в рX459.....	55
3.1.3. Конструювання репараційного шаблону.....	58
3.1.4. Трансфекція плазмідних векторів в клітинні лінії HeLa та селекція клітин, де відбулась необхідна рекомбінація.....	60
3.1.5. Перевірка клітинної лінії.....	61
3.1.6. Проведення мас-спектрометрії.....	63
3.1.7. Результати мас-спектрометричного аналізу.....	63
3.1.8. Біоінформатичний аналіз білкових взаємодій.....	65
3.1.9. Результати функціональної класифікації білків.....	68
3.1.10 Характеристика білків, асоційованих із RRP1B.....	69
ВИСНОВКИ.....	90
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	93
АНОТАЦІЯ.....	99
SUMMARY.....	99

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СПЕЦІАЛЬНИХ ТЕРМІНІВ

pРНК	—	рибосомальна РНК
tРНК	—	транспортна РНК
mРНК	—	матрична РНК
ДНК	—	дезоксирибонуклеїнова кислота
сДНК	—	комплементарна ДНК
CRISPR-Cas9	—	короткі паліндромні повтори, регулярно розташовані групами, асоційовані з білком Cas9; система для цілеспрямованого редагування геному
sgRNA	—	однониткова направляюча РНК (single guide RNA), яка визначає специфічність розпізнавання мішені системою CRISPR-Cas9
CSTB	—	ген цистатину В, що кодує інгібітор цистеїнових протеаз
HeLa	—	ракова клітинна лінія, отримана з клітин шийки матки людини
<i>RRP1B</i>	—	Ribosomal RNA Processing 1B; білок, залучений до регуляції метаболізму РНК та процесів у ядрі клітини
IP	—	імунопреципітація (immunoprecipitation), метод виділення специфічних білкових комплексів
MS	—	мас-спектрометрія (mass spectrometry), метод ідентифікації білків за масою і зарядом іонів
IP-MS	—	імунопреципітація з подальшим мас-спектрометричним аналізом

CDS	—	послідовність, що кодує білок (coding DNA sequence)
PBS	—	фосфатно-сольовий буфер (phosphate-buffered saline)
SDS-PAGE	—	електрофорез у поліакриламідному гелі з додаванням SDS (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
WT	—	дикий тип (wild type)
KO	—	нокаут (knockout), клітинна лінія або організм із вимкненим геном
KI	—	нокін (knock-in), клітинна лінія або організм із інтегрованим міченим або мутантним варіантом гена

ВСТУП

Актуальність роботи. Онкологічні захворювання продовжують збільшувати частку в глобальній смертності через збільшення загальної тривалості життя. Розробка засобів ранньої діагностики та лікування великої кількості гетерогенних онкологічних захворювань залежить не тільки від ідентифікації відповідальних генів, але й функціональної характеристики [4]. На сьогодні описано тисячі генів, соматичні мутації яких, спричиняють або впливають на розвиток онкологічних патологій. Але для більшості знайдених генів та їх мутацій не зібрано інформації щодо механізмів впливу на онкологічну патологію.

Робота сфокусована на дослідженні гена *RRP1B*, соматичні мутації якого нещодавно були ідентифіковані як фактор метастазійного росту в пухлинах молочної залози людини. На цей момент дані щодо функцій гена *RRP1B*, а також впливу на розвиток онкологічних захворювань надзвичайно обмежені. Розробка експериментальної моделі для вивчення даного гена в ракових клітинах людини на основі CRISPR-Cas9 технології модифікації геному дасть можливість функціонально охарактеризувати цей ген та покладе початок більш глибокого вивчення.

Планується проведення функціональної характеристики мутацій гена *RRP1B*, асоційованих з онкологічними захворюваннями, використовуючи розроблені модельні ракові клітинні лінії за допомогою геномної модифікації CRISPR-Cas9.

Мета дослідження: Дослідити функціональну роль *RRP1B* у клітинах людини шляхом аналізу його білкових взаємодій за допомогою методів протеоміки.

Завдання дослідження:

1. Ідентифікувати стратегію модифікації гена *RRP1B*: знайти направляючу РНК (sgRNA) та послідовності для гомологічної рекомбінації.
2. Побудувати плазмідні вектори для експресії в клітинах людини елементів системи CRISPR-Cas9.
3. Модифікувати клітини HeLa та провести селекцію функціонуючих клітинних ліній із модифікованим геном *RRP1B*.
4. Перевірити модельні клітини за допомогою імунопреципітації, вестерн-блот аналізу, мас-спектрометрії, а також імуофлуоресцентної мікроскопії.
5. Інтегрувати та проаналізувати протеомні дані для виявлення білкових партнерів *RRP1B*, а також визначення біологічних процесів і шляхів, у яких цей білок може бути задіяний.

Наукова новизна: Розроблені клітинні лінії на основі HeLa для експресії ендогенного рекомбінантного білка *RRP1B* з тегами для імунопреципітації та досліджень взаємодії *RRP1B* з іншими білками, а також у перспективі — для контрольованого нокауту за допомогою швидкої деградації.

Вперше проведено комплексний протеомний аналіз білкових взаємодій *RRP1B*, що дозволяє глибше зрозуміти його функціональну роль у клітинних процесах. Інтеграція протеомних даних відкриває нові можливості для дослідження молекулярних механізмів, у яких задіяний *RRP1B*, а також потенційних сигнальних шляхів, що можуть бути пов'язані з його функцією.

Практичне значення. Дані щодо білкових взаємодій *RRP1B* нададуть можливість зрозуміти у майбутніх дослідженнях як соматичні мутації цього білка можуть впливати на патогенез раку молочної залози.

Особистий внесок дипломника. Генерація плазмідних ДНК векторів, трансфекція клітин HeLa, селекція клональних клітинних ліній, що експресують RRP1B з тегами, іммунопресипітація й підготовка для масспектрометрії, анотація білків що взаємодіють з RRP1B.

У межах виконання магістерської роботи здійснено освоєння сучасних підходів до протеомного аналізу білкових взаємодій, проведено інтеграцію та інтерпретацію мас-спектрометричних даних з метою визначення потенційних білкових партнерів RRP1B. Підготовлено текст магістерської кваліфікаційної роботи та узагальнено отримані результати.

РОЗДІЛ 1

1.1 РНК – МЕТАБОЛІЗМ У ЯДРІ В ЗДОРОВИХ ТА РАКОВИХ КЛІТИНАХ

1.1.1 РНК-метаболізм як фундамент клітинної гомеостазу

Ядерний метаболізм РНК охоплює всі етапи життя транскриптів — від їхнього синтезу РНК-полімеразами до процесингу, контролю якості та експорту в цитоплазму. Цей багаторівневий процес визначає, які гени реалізуються у вигляді функціональних білків чи регуляторних некодуючих РНК, і таким чином забезпечує підтримання клітинної гомеостазії [1].

У здорових клітинах точна координація транскрипції, сплайсингу, формування 3'-кінця, деградації дефектних транскриптів і їхнього транспорту до цитоплазми гарантує стабільність транскриптома та контроль росту клітини. Порушення цих механізмів у онкологічних клітинах веде до дисбалансу експресії генів, появи патологічних ізоформ мРНК та некодуючих РНК, що сприяє проліферації, інвазивності й резистентності до терапії [2, 3].

Таким чином, дослідження ядерного метаболізму РНК є ключем до розуміння молекулярних механізмів канцерогенезу.

1.1.2. Транскрипція РНК-полімеразами II: регуляція в нормі та при онкології

В еукаріотичних клітинах РНК-полімераза II (Pol II) є ключовим ферментом, що відповідає за синтез з функціональних ДНК послідовностей (генів) мРНК та більшості некодуючих РНК. Її активність регулюється завдяки скоординованій взаємодії з транскрипційними

факторами, епігенетичними модифікаціями хроматину та факторами елонгації і термінації [4]. У нормальних клітинах ці процеси забезпечують баланс між точністю та швидкістю транскрипції, запобігаючи появі нефункціональних транскриптів.

В нормі ініціація транскрипції Pol II починається з формування преініціаційного комплексу на промоторі, що контролюється загальними транскрипційними факторами (TFIIA, TFIIB, TFIID та ін.) і коактиваторами, такими як комплекс Mediator. Активність Pol II також залежить від стану хроматину: ацетилювання гістонів сприяє транскрипції, тоді як метилювання певних лізинів гістонів асоціюється з репресією. Елонгація транскрипції вимагає участі факторів P-TEFb і DSIF, які забезпечують стійкість Pol II на ДНК-матриці. Точна термінація транскрипції пов'язана з рекрутуванням факторів 3'-кінцевого процесингу [5].

У пухлинних клітинах відзначається як гіперактивність Pol II, так і порушення її регуляції. Надмірна транскрипційна активність може призводити до надекспресії онкогенів (наприклад, MYC або CCND1), що стимулюють проліферацію. Водночас епігенетичні порушення (гіпоацетилювання або патологічне метилювання) часто знижують експресію генів-супресорів пухлин (наприклад, CDKN2A). Крім того, у багатьох раках описано зміни у факторах елонгації (наприклад, мутації у компонентах P-TEFb), які ведуть до дисбалансу експресії транскриптів, що регулюють цикл клітини й апоптоз [6].

Особливе значення мають суперенхансери - великі регуляторні ділянки, збагачені Pol II і транскрипційними факторами. Вони контролюють експресію генів, критичних для ідентичності клітини. У ракових клітинах суперенхансери часто перебудовуються, активуючи транскрипцію онкогенів і підтримуючи злоякісний фенотип [7].

Таким чином, транскрипція Pol II виступає не лише як базовий процес експресії генів, але й як критична точка, де відбуваються патологічні зміни, що ведуть до канцерогенезу. Її вивчення дозволяє зрозуміти механізми активації онкогенних програм та створює підґрунтя для нових терапевтичних стратегій, зокрема застосування інгібіторів елонгації або модифікаторів епігенетичних маркерів.

1.1.3. Сплайсинг пре-мРНК: альтернативний сплайсинг як маркер пухлинного стану

Сплайсинг пре-мРНК є наступним фундаментальним етапом ядерного метаболізму, що забезпечує видалення інтронів і з'єднання екзонів у функціональні транскрипти. Цей процес виконується складним рибонуклеопротейновим комплексом - сплайсосомою, до складу якої входять малі ядерні РНК та численні білкові фактори, що координують точність і швидкість реакцій. Важливим еволюційним надбанням еукаріотів став альтернативний сплайсинг, завдяки якому один ген може продукувати кілька різних ізоформ мРНК, що розширює функціональні можливості протеому й забезпечує клітинну адаптивність [8, 9].

У контексті онкології альтернативний сплайсинг відіграє двояку роль. З одного боку, він є механізмом фізіологічної регуляції, який дозволяє клітинам гнучко реагувати на сигнали середовища. З іншого боку, порушення у роботі сплайсингових факторів або зміни в регуляторних сигнальних шляхах призводять до появи патологічних ізоформ, що прямо впливають на пухлинний фенотип. Добре задокументовані приклади включають ізоформи білка BCL-X, де антиапоптотичний варіант BCL-XL сприяє виживанню клітин, або CD44, варіантні ізоформи якого посилюють міграцію та метастазування. Подібні перебудови описані також для білка p53, що є ключовим регулятором відповіді на пошкодження ДНК [10].

Таким чином, альтернативний сплайсинг розглядається не лише як наслідок злоякісної трансформації, а й як активний механізм, що сприяє прогресії пухлин. Специфічні ізоформи транскриптів можуть слугувати біомаркерами діагностики й прогнозу, а також ставати об'єктами терапевтичних підходів, зокрема у вигляді антисенсових олігонуклеотидів, спрямованих на відновлення правильного вибору сайтів сплайсингу [11, 12].

Отже, сплайсинг пре-мРНК - це не лише механізм формування функціональних транскриптів, але й важлива точка регуляції, зміни в якій можуть запускати або підтримувати онкогенні програми. Його дослідження дозволяє глибше зрозуміти молекулярну основу пухлинного фенотипу та відкриває перспективи для нових стратегій діагностики і терапії.

1.1.4. 3'-кінцевий процесинг і поліаденілювання: контроль стабільності транскриптів

Формування 3'-кінця мРНК є наступним етапом у ядерному метаболізмі РНК, який визначає стабільність, трансльованість і регуляцію транскриптів. Процесинг включає ендонуклеолітичне розрізання пре-мРНК у специфічному сайті та подальше додавання полі (А)-хвоста за допомогою полі (А)-полімерази. Полі (А)-послідовність виконує кілька функцій: захищає мРНК від деградації екзонуклеазами, сприяє експорту з ядра та взаємодії з рибосомами під час трансляції [13].

Ключовим регуляторним аспектом цього процесу є альтернативне поліаденілювання (АРА), яке дозволяє утворювати мРНК з різними довжинами 3'-нетрансльованої ділянки (3'-UTR). Наявність чи відсутність регуляторних елементів у 3'-UTR, зокрема сайтів зв'язування мікроРНК і РНК-зв'язувальних білків, визначає подальшу долю транскрипту: його стабільність, локалізацію та ефективність трансляції [14].

В онкологічних клітинах спостерігається характерне зрушення до використання проксимальних поліаденіляційних сайтів, що призводить до укорочення 3'-UTR. Укорочені транскрипти втрачають сайти зв'язування мікроРНК і, таким чином, уникають негативної посттранскрипційної регуляції. Це сприяє надекспресії онкогенів, зокрема MYC, CCND1 та VEGF, які у нормальних умовах частково пригнічуються через взаємодію з мікроРНК [13]. Таке перепрограмування поліаденілювання вважається важливим механізмом пухлинної прогресії.

Більше того, дефекти у білках, що беруть участь у формуванні 3'-кінця (наприклад, CPSF, CstF), також асоціюються з канцерогенезом. Зміни у їхній експресії можуть глобально впливати на транскриптом, зрушуючи рівновагу у бік транскриптів, що сприяють росту та виживанню клітин [13].

Таким чином, 3'-кінцевий процесинг і поліаденілювання виступають не лише як механізм завершення транскрипції, а й як важливий рівень регуляції експресії генів. Порушення у цьому процесі формують сприятливі умови для канцерогенезу, надаючи клітинам здатність до підвищеної проліферації та стійкості до регуляторних сигналів. Вивчення альтернативного поліаденілювання відкриває перспективи використання його як діагностичного маркера і як мішені для терапевтичних інтервенцій.

1.1.5. Ядерний контроль якості РНК: деградація дефектних транскриптів

Точність експресії генів залежить не лише від правильного синтезу та процесингу транскриптів, а й від надійної системи контролю їхньої якості. У ядрі існують спеціалізовані механізми, які розпізнають і видаляють дефектні або неповністю оброблені пре-мРНК. Ключову роль у цьому процесі відіграє ядерна екзосома - багатокомпонентний

екзорибонуклеазний комплекс, який деградує некоректні РНК та запобігає їхньому експорту до цитоплазми [15].

Додатковими елементами системи контролю виступають білки, що розпізнають помилки у сплайсингу, дефекти у формуванні 5'-кеп-структури або 3'-кінця, а також системи, що реагують на передчасні стоп-кодони (nonsense-mediated decay, NMD) уже в цитоплазмі. Завдяки цим механізмам клітина підтримує високий рівень точності транскриптома, захищаючи себе від появи нефункціональних або потенційно токсичних білків [16].

У ракових клітинах відзначається зниження ефективності цих механізмів. Дисфункція екзосоми або порушення ядерних механізмів контролю якості транскриптів сприяють накопиченню дефектних РНК, що можуть виконувати онкогенні функції.

Наприклад, у разі порушення активності факторів MTR4 або ZC3H18, що забезпечують рекрутування екзосоми до некоректно оброблених пре-мРНК, відбувається накопичення незрізаних транскриптів у нуклеоплазмі. Такі РНК можуть формувати атипові рибонуклеопротейнові комплекси, які впливають на регуляцію експресії генів та сприяють пухлинній трансформації клітин [16]. Крім цього, дефектні транскрипти здатні виступати як неоантигени, модифікуючи взаємодію пухлинних клітин з імунною системою [17].

Накопичення помилкових транскриптів створює транскриптомну нестабільність, яка, разом із геномною та епігенетичною, є однією з характерних ознак пухлинного процесу. Саме тому вивчення механізмів ядерного контролю якості РНК має не лише фундаментальне значення, а й потенційне прикладне застосування - від створення біомаркерів до розробки терапевтичних стратегій, що модулюють активність екзосоми або NMD.

1.1.6. Експорт РНК з ядра: баланс між якістю та швидкістю

Після завершення процесингу мРНК має бути експортована з ядра в цитоплазму, де відбувається її трансляція. Цей етап є критичною точкою регуляції, оскільки він визначає, які транскрипти будуть включені в білковий синтез. Експорт РНК здійснюється за участі транспортних білкових комплексів, головним чином NXF1–NXT1, що взаємодіють із зрілими мРНК і забезпечують їхнє проходження через ядерні пори [18].

Система експорту поєднана з механізмами контролю якості: до цитоплазми допускаються лише транскрипти, які пройшли кепування, сплайсинг та поліаденілювання. Це гарантує, що дефектні або неповністю оброблені РНК не братимуть участі у трансляції. У здорових клітинах такий баланс між якістю та швидкістю є необхідним для підтримання гомеостазу й запобігання синтезу нефункціональних білків [19].

В онкологічних клітинах відзначається дерегуляція цього процесу. Надмірна активність транспортних комплексів або перебудова сигналів, що регулюють експорт, може сприяти прискореному виходу транскриптів у цитоплазму навіть у випадку їхнього неповного процесингу. Це дозволяє клітинам підтримувати високий рівень білкового синтезу, необхідного для швидкої проліферації, але водночас підвищує ризик накопичення патологічних білкових ізоформ [20].

Крім мРНК, специфічні механізми експорту існують і для інших класів РНК. Наприклад, транспорт tRNA і snRNA здійснюється з участю експортованих білків родини karyopherin/CRM1. При онкологічних процесах зміни у цих шляхах можуть сприяти дисбалансу в роботі сплайсосоми та рибосомального апарату, що ще більше підсилює пухлинний фенотип [21].

Ядерний експорт РНК є не лише завершальним етапом їхнього біогенезу, а й додатковим рівнем контролю експресії генів. Порушення у

цьому процесі формують середовище для підвищеної пластичності пухлинних клітин та сприяють їхній адаптації до умов стресу і терапії.

1.1.7. Некодуючі ядерні РНК (snRNA, snoRNA, lncRNA): приховані регулятори

Окрім мРНК, у ядрі функціонує широкий спектр некодуючих РНК, які не трансклюються у білки, але виконують критичні регуляторні функції. До них належать малі ядерні РНК (snRNA), малі нуклеоларні РНК (snoRNA) та довгі некодуючі РНК (lncRNA). Кожен із цих класів забезпечує точність та ефективність ключових етапів ядерного метаболізму РНК.

Так, snRNA є складовою частиною сплайсосоми, де вони формують основу для розпізнавання інтрон-екзонних меж та каталізу реакцій вирізання інтронів. Зміни у snRNA або білкових факторах, що з ними асоціюються, можуть спричиняти аномальний сплайсинг, який безпосередньо пов'язаний із формуванням онкогенних транскриптів.

Відомо, що snoRNA локалізуються в ядерцях і беруть участь у модифікації рРНК та snRNA (2'-О-метилування, псевдоуридилування), забезпечуючи функціональну зрілість рибосом і сплайсосоми. У ракових клітинах описані випадки надекспресії окремих snoRNA, які асоціюються з підвищеною активністю біосинтезу білка та проліферацією [22].

lncRNA становлять найбільш різноманітну групу некодуючих ядерних РНК. Вони можуть регулювати транскрипцію шляхом рекрутування хроматин-ремоделюючих комплексів, модифікувати тривимірну організацію геному або виступати «молекулярними губками» для мікроРНК. У контексті онкології lncRNA часто виконують роль «онколНК» або «супресорних лНК», впливаючи на експресію онкогенів чи генів-супресорів. Наприклад, HOTAIR змінює епігенетичний ландшафт хроматину та асоціюється з інвазивними пухлинами, а MALAT1 регулює

альтернативний сплайсинг і корелює з метастатичним потенціалом [23, 24].

Некодуючі ядерні РНК, попри відсутність білок-кодуючої функції, є «прихованими регуляторами», що визначають стабільність та динаміку транскриптома. У пухлинних клітинах їхні зміни сприяють перепрограмуванню експресії генів, підвищенню пластичності й формуванню злоякісного фенотипу. Це робить ncRNA не лише індикаторами порушень клітинної регуляції, але й перспективними діагностичними та терапевтичними мішенями.

1.1.8. Зв'язок ядерного РНК-метаболізму з клітинним фенотипом і пухлинною прогресією

Ядерний метаболізм РНК виступає інтеграційним центром регуляції клітинної життєдіяльності, і будь-які зміни в його роботі безпосередньо відбиваються на фенотипі клітини. Кожен етап — транскрипція, сплайсинг, поліаденілювання, контроль якості та експорт — формує якісний і кількісний склад транскриптома. У нормі ця система забезпечує рівновагу між проліферацією, диференціюванням і програмованою загибеллю клітин. Порушення у цих процесах в онкологічних клітинах запускають каскад змін, що веде до утворення злоякісного фенотипу.

Однією з ключових ознак є підвищена пластичність транскриптома, яка виникає внаслідок дисрегульованого альтернативного сплайсингу та поліаденілювання. Це дозволяє пухлинним клітинам продукувати ізоформи білків, що підтримують проліферацію навіть в умовах дефіциту поживних речовин чи терапевтичного стресу [25].

Другою важливою характеристикою є уникнення імунного нагляду. Неправильно оброблені транскрипти та укорочені 3'-UTR формують білкові варіанти, які маскують клітину від імунної відповіді або змінюють презентацію пухлинних антигенів. Додатково, зміни у некодуючих РНК,

зокрема lncRNA, сприяють епігенетичному перепрограмуванню, яке посилює імунну толерантність до пухлини [23].

Третім проявом є резистентність до терапії. Аномальний РНК-метаболізм призводить до накопичення транскриптів, що кодують білки з антиапоптотичними або репаративними властивостями. Такі білки дозволяють клітинам витримувати вплив хіміотерапевтичних препаратів, інгібіторів сигнальних шляхів або навіть імунотерапії [12].

Зміни у ядерному метаболізмі РНК не є лише побічним явищем пухлинної трансформації, а виступають центральним механізмом канцерогенезу. Вони інтегрують генетичні, епігенетичні та транскрипційні порушення у єдину систему, що формує агресивний клітинний фенотип і визначає здатність пухлини до прогресії та метастазування.

1.1.9. Перспективи: націлення на ядерні процеси РНК як терапевтична стратегія

Порушення ядерного метаболізму РНК дедалі більше визнаються не просто вторинним наслідком пухлинної трансформації, а ключовим механізмом, що підтримує агресивність та життєздатність пухлинних клітин. Це відкриває перспективу для терапевтичного втручання безпосередньо у процеси транскрипційного і посттранскрипційного контролю.

Одним із найінтенсивніше досліджуваних напрямів є інгібітори сплайсингу. Молекули, що націлюють сплайсому або окремі сплайсингові фактори (наприклад, SF3B1), здатні змінювати вибір сайтів сплайсингу і тим самим пригнічувати утворення онкогенних ізоформ. Клінічні дослідження таких сполук уже демонструють ефективність при гематологічних злоякісностях [26].

Інший підхід пов'язаний із застосуванням антисенсових олігонуклеотидів, які можуть коригувати сплайсинг окремих мРНК або

впливати на стабільність транскриптів. Ця стратегія вже використовується у клінічній практиці для лікування спадкових хвороб, і поступово розширюється на онкологію [24].

Перспективними виглядають також інгібітори факторів елонгації транскрипції (наприклад, CDK9-інгібітори), які знижують активність РНК-полімерази II в онкоген-залежних клітинах. Такі препарати можуть бути особливо корисними у випадках «транскрипційної залежності» пухлин, коли виживання клітин обумовлене гіперактивністю певних генів [1].

Ще один напрямок – модулювання альтернативного поліаденілювання, яке може відновити регуляторні можливості мікроРНК та знизити експресію онкогенів із вкороченими 3'-UTR. Хоча цей підхід перебуває на стадії ранніх досліджень, він демонструє значний потенціал у боротьбі з пухлинами, які використовують АРА для уникнення регуляції [14].

Нарешті, зростає інтерес до таргетування lncRNA. Використання малих молекул, CRISPR-орієнтованих технологій або олігонуклеотидів для пригнічення онкогенних довгих некодуючих РНК (наприклад, HOTAIR, MALAT1) може стати ще одним напрямком персоналізованої терапії [23].

Ядерні процеси РНК перетворюються на привабливу терапевтичну мішень, здатну не лише блокувати пухлинний ріст, але й подолати резистентність до стандартних методів лікування. Подальший розвиток цього напрямку може радикально змінити підходи до лікування онкологічних хвороб, зробивши транскриптомні інтервенції важливим компонентом майбутньої протипухлинної терапії.

1.2 СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ГЕН *RRP1B*

1.2.1. Структура гена *RRP1B* та білка

RRP1B (англ. Ribosomal RNA processing 1B) – білок, який кодується однойменним геном, розташованим у людей на довгому плечі 21-ї хромосоми. За допомогою аналізу геномної послідовності зіставили ген *RRP1B* із хромосомою 21q22.3, проксимальною до гена цистатину В (*CSTB*; 601145) [27]. Ген *RRP1B* також розташований на 75 т.п.н. проксимальніше гена *RRP1*. Він має 2 транскрипти, 198 ортологів та 1 паролог [28] (Рис. 1.1).

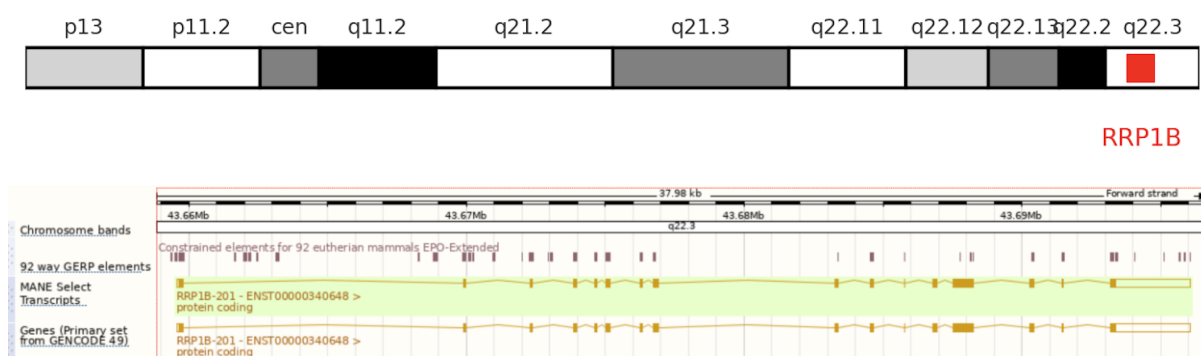
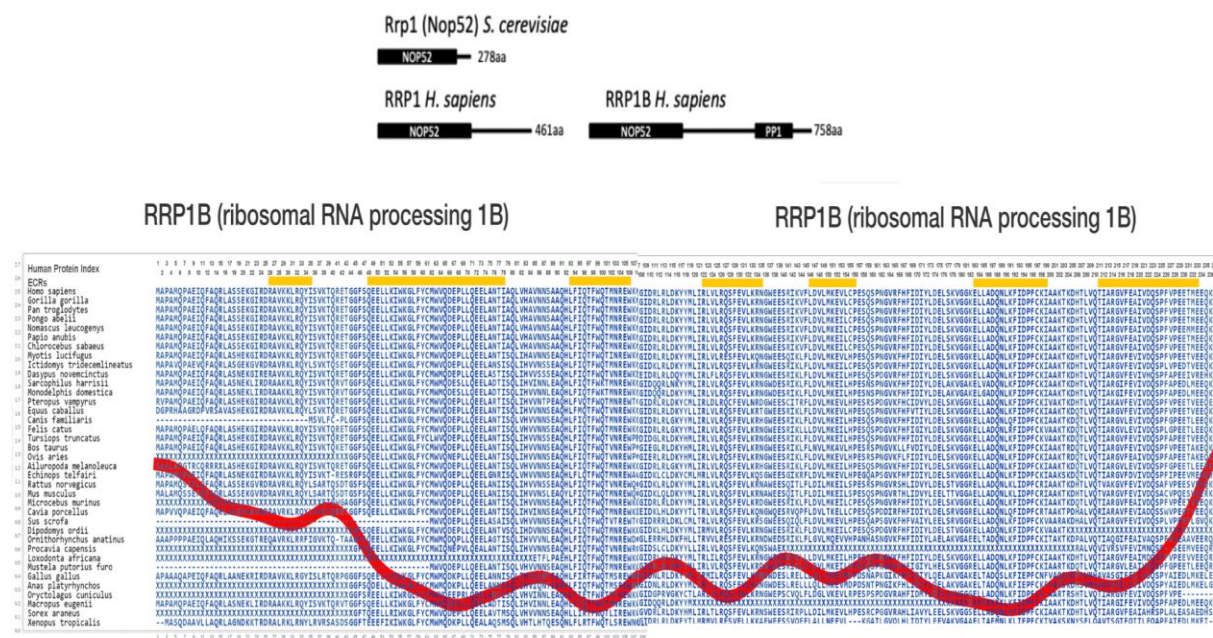


Рис.1.1 А - Розміщення на хромосомі; Б - Структура гена.

Довжина поліпептидного ланцюга білка становить 758 амінокислот, а молекулярна маса — 84 428, містить 16 екзонів [27]. Кодований геном білок за функцією належить до фосфопротеїнів (складні білки, хімічно зв'язані із однією або кількома фосфатними групами, що приєднуються до них в процесі фосфорилювання.). Задіяний у таких біологічних процесах, як ацетилювання, альтернативний сплайсинг [29].

У людини гени *RRP1* і *RRP1B* кодують два паралельні гомологи (паралоги) дріжджового *Rrp1p* — компонента 66S пре-рибосоми, яка передує формуванню 60S субодиниці. *RRP1B* локалізується в ядерці, виступає як регулятор націлювання фосфатази PP1 на пре-60S субодиниці і, ймовірно, бере участь у біогенезі рРНК. Порівняльний аналіз білкових

структур показує, що в обох гомологів N-кінцева частина містить домен NOP52, тоді як C-кінцева область *RRP1B* значно довша й характеризується великим числом внутрішньо-неупорядкованих регіонів (IDR), що може вказувати на диференційовану роль у складному білковому комплексі. (рис 1.2A) [30].



Людський *RRP1B* складається з 758 амінокислот і містить амінотермінальний домен NOP52 та три ядерних сигнали локалізації, розташовані близько карбокси-термінального домену. Мишиний *RRP1B* складається з 724 амінокислот і має 62% схожість послідовності з людським *RRP1B* [30].

1.2.3. Специфіка *RRP1B* пов'язана з функціями в нуклеоплазмі

Фарбування антитілами до ендогенного *RRP1B* показало, що в необроблених клітинах він переважно знаходиться в нуклеолах (83,7%), 16% в нуклеоплазмі та 0,3% в цитоплазмі. Це розподіл змінюється після обробки ActD і DRB, з великим збільшенням нуклеоплазмичної фракції (відповідно 45,3 і 67%) та зменшенням нуклеолярної фракції (відповідно 54 і 32%). *RRP1B* не виявляється в значущих кількостях в цитоплазмі при будь-яких умовах. Обробка актиноміцином D (ActD) в концентрації, яка інгібує як РНК полімерази I, так і II транскрипцію як рибосомальних, так і звичайних генів (2,5 мкг/мл протягом 2 годин), призводить до перерозподілу пулу нуклеолярного *RRP1B* в нуклеоплазму [32].

Нуклеоплазмичний пул *RRP1B* включає невеликі ділянки, розподілені по всьому ядру. Залишений нуклеолярний *RRP1B* зберігається як у центральному тілі, так і на периферії нуклеолі. Обробка 5,6-Дихлоро-1- β -d-рибофуранозилбензимидазолом DRB (25 мкг/мл протягом 2 годин) призводить до розпаду нуклеолярної структури та перерозподілу *RRP1B* до невеликих гранул та додаткових мас, що оточують ці гранули. Нуклеоплазматична локалізація, а також перерозподіл білку між компартментами у випадку блокування синтезу РНК говорить про додаткові, не вивчені функції *RRP1B* поза біогенезом рибосомальних РНК [32].

1.3 ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНА *RRP1B* В ОНКОЛОГІЇ

1.3.1 *RRP1B* як модифікатор метастазування у онкології

Ген *RRP1B* (Ribosomal RNA Processing 1B), який спершу був відомий завдяки своїй участі в організації ядерцевих структур і біогенезі рРНК, за останні десятиліття набув репутації одного з ключових кандидатних генів-модифікаторів, що визначають метастатичний потенціал пухлинних клітин. Його значення в онкології пов'язують насамперед із впливом на транскрипційні програми та альтернативний сплайсинг, що має критичне значення для прогресії та поширення злоякісних новоутворень.

Одним із перших підтверджень цього стала демонстрація здатності *RRP1B* взаємодіяти з фактором сплайсингу SRSF1 — добре відомим онкогенним білком, який визначає вибір сайтів сплайсингу та формує профіль ізоформ мРНК. Було показано, що така взаємодія змінює експресію генів, які беруть участь у контролі клітинного циклу, апоптозу, адгезії та міграції, що зрештою сприяє підвищеній інвазивності та формуванню метастатичних колоній [30].

Подальші дослідження на модельних системах раку молочної залози підтвердили, що рівень експресії *RRP1B* прямо корелює з метастатичним потенціалом. Кількісне картування локусів (QTL-аналіз) показало, що надекспресія цього гена сприяє активації транскрипційних програм, які формують агресивний фенотип клітин, тоді як його зниження асоціюється зі зменшенням здатності до метастазування. Важливо, що *RRP1B* не можна віднести ані до класичних онкогенів, ані до генів-супресорів: він діє як модифікатор, змінюючи активність інших генів та регуляторних мереж, що пояснює відмінності у клінічному перебігу за однакових характеристик первинної пухлини [33].

Додатковим підтвердженням ролі RRP1B у клінічному контексті стали дослідження його генетичних варіацій. Найбільш вивченим є одонуклеотидний поліморфізм 1307T>C у геномній послідовності, асоційованій з цим геном. Генотипування показало, що носійство алеля C корелює з підвищеним ризиком метастатичної прогресії: пацієнтки з TC або CC-генотипами значно частіше мали віддалені метастази, ніж носії TT-варіанта. Це доводить, що навіть одиночні зміни у ДНК, пов'язані з RRP1B, здатні впливати на клінічні прояви та прогноз захворювання [30-33].

Нові дослідження ще більше розширили уявлення про функції RRP1B, показавши, що він стабільно асоціюється з PAXT-комплексом, до складу якого входить білок ZFC3H1 — адаптор ядерної екзосоми, що відповідає за утримання полі(A)+ транскриптів у ядрі перед їх деградацією. Роботи групи Torben Heick Jensen продемонстрували, що порушення роботи цього комплексу призводить до накопичення транскриптів у ядрі, що підкреслює його ключову роль у підтриманні РНК-гомеостазу [34]. Ураховуючи, що дисбаланс ядерних РНК є одним із визначальних чинників канцерогенезу, асоціація RRP1B з PAXT дозволяє пояснити, як мутації або поліморфізми цього гена можуть впливати на злоякісну трансформацію та прогресію пухлин.

Білок RRP1B можна розглядати як інтегральний компонент молекулярних мереж, що визначають метастатичний потенціал пухлинних клітин. Його функції виходять за межі класичної ролі у біогенезі рРНК та охоплюють широкий спектр транскрипційних і посттранскрипційних процесів. Хоча еволюційно RRP1B є гомологом дріжджового Rrp1p, який бере участь у формуванні великої субодиниці рибосоми, функціональна диверсифікація цього білка у людини привела до появи додаткових ролей у нуклеоплазмі. Саме недостатньо вивчені позаядерцеві функції RRP1B, імовірно пов'язані з регуляцією експресії генів та процесингом мРНК,

можуть пояснювати його залучення в онкогенез та асоціацію мутацій гена з онкологічними патологіями.

Накопичені експериментальні та клінічні дані підтверджують його значення як прогностичного маркера та перспективної мішені для терапії. Подальші дослідження, зокрема системні протеомні аналізи та детальне вивчення функціональних наслідків поліморфізмів, відкривають нові можливості для застосування RRP1B у персоналізованій онкології.

1.4 ПРОТЕОМНИЙ АНАЛІЗ

1.4.1 Значення протеомного аналізу в медико-біологічних та онкологічних дослідженнях

Протеомний аналіз є одним із ключових інструментів сучасної молекулярної біології та біомедицини, оскільки дозволяє досліджувати реальний вміст білків у клітині, їхню кількість, локалізацію, модифікації та взаємодії. На відміну від геноміки та транскриптоміки, які відображають потенційний рівень експресії, протеоміка показує фактичний функціональний стан клітини, що має вирішальне значення для розуміння молекулярних механізмів здоров'я та хвороби [35].

Розвиток технологій мас-спектрометрії високої роздільної здатності, кількісної протеоміки та біоінформатичних методів дозволив здійснювати системне картування білкових мереж у нормі та при патології, що стало основою для вивчення онкологічних, нейродегенеративних, серцево-судинних і метаболічних захворювань [36].

У медичних дослідженнях протеоміка відіграє ключову роль завдяки можливості виявляти специфічні зміни білкових профілів, які виступають діагностичними або прогностичними маркерами та дозволяють оцінювати ефективність терапії. Саме білки є основними виконавцями клітинних процесів, тому їх комплексне вивчення дає можливість глибоко

проаналізувати перебіг патологічних станів і визначити потенційні терапевтичні мішені [36, 37].

У дослідженні онкологічних захворювань протеомний аналіз має особливу цінність, оскільки ракові клітини характеризуються масштабною перебудовою білкових мереж. Протеоміка дає змогу визначати зміни в білках, що контролюють проліферацію, апоптоз, інвазію, ангиогенез, метастазування та формування резистентності до терапії. Особливу увагу приділяють білкам-супресорам пухлин, таким як p53, а також білкам, що входять до специфічних комплексів, зміна яких супроводжує прогресію пухлини [37, 38].

Аналіз динаміки протеомних профілів на різних стадіях захворювання дозволяє реконструювати молекулярні механізми канцерогенезу, визначати ранні маркери пухлин та відкривати нові можливості для таргетної терапії [38].

Особливо важливим напрямом є застосування протеоміки в персоналізованій медицині. Вивчення індивідуальних білкових «підписів» пацієнтів створює можливість підбору терапії на основі унікальних молекулярних характеристик організму. Протеомні біомаркери дедалі активніше використовуються для діагностики, прогнозування та моніторингу терапевтичної відповіді при онкологічних, серцево-судинних та метаболічних захворюваннях [39].

Неінвазивні протеомні маркери з плазми крові, сечі чи ліквору значно розширили можливості раннього виявлення раку молочної залози, простати, легень, а також нейродегенеративних патологій [39].

Таким чином, протеоміка виконує дві стратегічні функції: по-перше, забезпечує глибоке розуміння індивідуальної біології пацієнта, а по-друге - створює молекулярну основу для персоналізованих терапевтичних рішень.

Це робить протеомний аналіз фундаментальним елементом сучасних медичних та онкологічних досліджень, який поєднує фундаментальну біологію з практичною клінічною медициною [37, 39].

1.4.2 Протеомний аналіз як інструмент для вивчення білкових взаємодій

Білкові взаємодії є основою функціонування клітини, забезпечуючи координацію біохімічних реакцій, сигнальних шляхів і регуляторних механізмів. Жоден білок не функціонує ізольовано — більшість клітинних процесів реалізується завдяки утворенню складних білкових комплексів, які забезпечують точність і регульованість внутрішньоклітинних процесів. Вивчення цих взаємодій є ключовим завданням сучасної молекулярної біології, оскільки саме вони визначають клітинну відповідь на внутрішні та зовнішні стимули, а також беруть участь у патогенезі багатьох захворювань, включно з онкологічними й нейродегенеративними [40,41].

Протеомний аналіз відіграє центральну роль у виявленні білкових взаємодій, оскільки дозволяє отримати цілісне уявлення про склад, динаміку й функціональні властивості протеїнів у клітині. На відміну від геноміки чи транскриптоміки, які відображають лише потенційну можливість синтезу білків, протеоміка досліджує фактичний білковий склад клітини та його зміни в реальному часі. Особливо важливим є вивчення посттрансляційних модифікацій (фосфорилювання, ацетилювання, убіквітинування), які визначають активність, локалізацію та стабільність білків, а отже, і якість їхніх взаємодій [35].

Завдяки поєднанню мас-спектрометрії високої роздільної здатності, методів білкового збагачення та біоінформатики протеоміка перетворилася на універсальний інструмент системної біології. Вона не лише описує індивідуальні білки, а й дозволяє картувати цілісні мережі

їхніх взаємодій, виявляти нові білкові комплекси та пов'язувати їх із фізіологічними і патологічними процесами. Це робить протеомний аналіз невід'ємною частиною сучасних медичних досліджень і перспективним напрямом розвитку персоналізованої медицини.

1.4.3 Методи протеомного аналізу для дослідження білкових взаємодій

Одним із найпотужніших підходів у протеомному аналізі є мас-спектрометрія (MS), яка дозволяє ідентифікувати білки в складних біологічних сумішах з високою чутливістю і специфічністю. Для дослідження білкових взаємодій найчастіше використовуються такі методи:

Імунопреципітація та IP-MS. Першим кроком у багатьох дослідженнях є імунопреципітація (IP) — метод, коли специфічне антитіло «виловлює» білок-мішень разом із його партнерами з клітинного лізату. Якщо до цього процесу додається мас-спектрометрія (IP-MS - налітичний метод, що дозволяє ідентифікувати та кількісно визначати молекули шляхом вимірювання співвідношення маси до заряду (m/z) іонізованих частинок), то після виділення комплексу білки розщеплюють на пептиди й аналізують їх склад. Таким чином можна визначити не лише вже відомі, але й нові взаємодії, а також простежити, як змінюється білковий комплекс за різних умов [42].

Афінна очистка з подальшою мас-спектрометрією (AP-MS). Схожим за принципом є метод афінної очистки (AP-MS), проте замість антитіл тут застосовуються спеціальні білкові мітки (His-, FLAG-, HA-теги). Це спрощує виділення білка-мішені та підвищує відтворюваність результатів. Метод особливо зручний для великомасштабних експериментів, де потрібно картувати цілу мережу білкових взаємодій [40].

Особливе значення серед епітопних міток має FLAG-tag — короткий пептид із послідовністю DYKDDDDK, який додають до білка за допомогою рекомбінантних технологій. Його перевага в тому, що він невеликий і зазвичай не впливає на структуру чи функцію білка, для нього існують високоспецифічні антитіла, а сам тег можна розташувати як на N-, так і на C-кінці білкової послідовності. Це робить FLAG одним із найпопулярніших інструментів для селективного виділення білків та їхніх комплексів у AP-MS та TAP-MS дослідженнях [43].

Хімічне зшивання білків (Cross-linking MS). Цей метод ґрунтується на застосуванні спеціальних хімічних реагентів, що утворюють ковалентні зв'язки між білками, які знаходяться у безпосередній близькості один до одного. Такий підхід дозволяє отримати інформацію про просторову організацію білкових комплексів і їх взаємодії на рівні молекулярної структури [40].

Тандемна афінна очистка (TAP-MS). Ця методика передбачає двоетапне очищення білкового комплексу для зменшення рівня неспецифічних взаємодій. Використання TAP-тегів дає змогу отримати високоякісні дані про стабільні білкові комплекси [40].

Ядерний магнітний резонанс (NMR) та рентгенівська кристалографія. Хоча ці методи використовуються рідше, вони дозволяють отримати структурну інформацію про білкові взаємодії на атомарному рівні, що є важливим для розуміння механізмів їх роботи [40].

1.4.4 IP-MS експеримент.

Типовий експеримент з імунопреципітацією з подальшою мас-спектрометрією (IP-MS) складається з кількох послідовних кроків, кожен із яких визначає якість і змістовність результатів. Спочатку у клітинах експресують досліджуваний білок; часто до нього додають невелику епітопну мітку (наприклад, FLAG-tag DYKDDDDK), що полегшує

селективне виділення комплексу без істотного впливу на функцію білка [43].

Далі клітини лізують, а білок-«мішень» разом з його партнерами «виловлюють» специфічним антитілом. На етапі промивань критично важливо зберегти баланс: надто жорсткі умови зменшують фоновий сигнал, але можуть «змити» слабкі/транзиторні, біологічно релевантні взаємодії; надто м'які — підвищують ризик контамінацій і неспецифічних зв'язувань. Саме тому сьогодні часто застосовують помірні умови й компенсують можливий фон подальшим кількісним аналізом та статистичною фільтрацією [44-45].

Після елюції комплекс готують до MS-аналізу: білки ферментативно розщеплюють (зазвичай трипсином) на пептиди, які іонізують і детектують у мас-спектрометрі; отримані спектри порівнюють із білковими базами даних для ідентифікації складу комплексу. Сучасні прилади дають змогу одночасно охоплювати сотні/тисячі білків та реєструвати їх посттрансляційні модифікації, що суттєво розширює аналітичні можливості IP-MS [35].

На виході формують кількісну матрицю інтенсивностей (label-free quantification, LFQ), яку використовують для порівняння дослідних і контрольних умов. Інтенсивнісно-орієнтовані алгоритми та платформи (наприклад, MaxLFQ у складі MaxQuant) підвищують точність порівнянь і дозволяють надійніше відрізнити справжніх партнерів від фонового сигналу навіть за м'яких умов очищення [46-47].

1.4.5 Принципи аналізу даних

На початкових етапах розвитку IP-MS ідентифікація білкових взаємодій здебільшого ґрунтувалася на порівнянні списків білків, виявлених у контрольних та експериментальних вибірках. У цьому підході взаємодіючими вважали ті білки, які визначалися у зразках з експресією

білка-мішені, але були відсутні у контролях (наприклад, у клітинах без експресії міченого білка). Така стратегія дозволяла швидко відокремити потенційні партнери, проте з розвитком високочутливих мас-спектрометрів вона виявилася менш придатною через значний рівень фонових сигналів і детекцію неспецифічних білків [40].

Сьогодні дедалі більшого значення набуває застосування кількісної протеоміки, яка дає можливість не лише фіксувати присутність білків, але й порівнювати їхні рівні між експериментальними та контрольними умовами. Це забезпечує вищу точність і дозволяє зменшити вплив фону. Для цього розроблені алгоритми статистичного аналізу, такі як CompPASS, MiST і SAINT, що оцінюють взаємодії на основі кількісних показників та визначають білки з найбільш достовірною ймовірністю взаємодії [41].

Особливе місце займає використання підходів label-free quantification (LFQ). На відміну від методів із міченням (SILAC, iTRAQ), LFQ базується на вимірюванні інтенсивності сигналу пептидів у мас-спектрометрі без додаткового маркування. Це дозволяє аналізувати велику кількість зразків одночасно, мінімізує витрати та підвищує гнучкість експериментів. Використання LFQ у поєднанні зі статистичними алгоритмами (наприклад, SAINTq, що працює з інтенсивнісними даними) значно підвищує достовірність результатів та забезпечує можливість застосовувати суворіші порогові значення (наприклад, fold change >10 та $p < 0.01$) для визначення висококонфідентних взаємодій [46].

Сучасний аналіз даних у IP-MS спирається на поєднання м'яких експериментальних умов для збереження максимальної кількості взаємодій та застосування LFQ-інтенсивностей як бази для кількісної оцінки. Це забезпечує високу чутливість, знижує ризик хибнопозитивних результатів і дозволяє більш надійно реконструювати інтерактоми у складному клітинному середовищі.

1.4.6 Попередня обробка даних та оцінка результатів

Сирі спектральні дані, отримані за допомогою мас-спектрометрії, містять велику кількість інформації, проте вони не можуть бути безпосередньо використані для аналізу білкових взаємодій без етапу попередньої обробки. У дослідженнях IP-MS саме цей крок визначає якість кінцевих висновків, оскільки від правильності підготовки даних залежить достовірність ідентифікації справжніх взаємодій.

Основні етапи попередньої обробки

1. Логарифмічне перетворення.

Кількісні значення інтенсивності сигналів білків мають широкий динамічний діапазон, що ускладнює їх пряме порівняння. Для нормалізації даних застосовується $\log_2$ -трансформація, яка робить розподіл ближчим до нормального та полегшує використання параметричних статистичних методів [48].

2. Видалення контамінантів та низькоякісних даних. Загальні забруднювачі (наприклад, кератини, білки сироватки, ферменти, що використовуються при підготовці зразків) та реверсні білки, які додаються у бази для контролю рівня хибнопозитивних ідентифікацій, підлягають видаленню. Також усуваються білки, які ідентифікуються лише у поодиноких реплікатах і не мають статистичної надійності [46,48].

3. Імпутація відсутніх значень.

Пропущені значення є типовою проблемою для протеомних досліджень. Для їх корекції застосовуються статистичні методи, зокрема імпутація — заміна пропусків малими значеннями, змодельованими на межі виявлення приладу. Це дозволяє зберегти дані у цілісному вигляді для подальшого аналізу [46].

Після попередньої обробки отримані результати оцінюють на предмет їхньої відповідності очікуваним. Якщо спостерігаються відхилення, необхідно враховувати кілька можливих причин:

- Недостатня ідентифікація білків може бути наслідком низької кількості вихідного матеріалу або втрати білків під час підготовки зразків.
- Невиявлення цільового білка може свідчити про низьку специфічність антитіла чи про недостатню ефективність імунопреципітації.
- Надмірна кількість взаємодіючих білків часто пов'язана з різницею між умовами у контрольних та дослідних групах (наприклад, різна кількість клітин чи концентрація антитіл).

Оптимізація експериментальних параметрів, таких як вибір антитіл високої специфічності, контроль умов промивання, стандартизація протоколів і застосування сучасних алгоритмів аналізу даних (CompPASS, MiST, SAINTq), дозволяє мінімізувати ці проблеми і підвищити точність і достовірність результатів [40].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Дизайн дослідження У ході дослідження було проведено протеомний аналіз білку RRP1B в HeLa клітинах модифікованого за допомогою методики CRISPR-Cas9 для очистки за допомогою афінного FLAG-тегу. Білки, які взаємодіють з РРР1б було класифіковано за функціональними параметрами для визначення механізму участі РРР1б в метаболізмі РНК в ракових клітинах.

Об'єкт дослідження – Ракова клітинна лінія HeLa.

Предмет дослідження – Функції білка RRP1B (продукту гена *RRP1B*).

Методи – молекулярно-генетичні методи: CRISPR-Cas9, імунопреципітації, вестерн-блот, полімеразна ланцюгова реакція, імуофлюоресцентна мікроскопія, молекулярне клонування, культивування клітин, мас-спектромерія (табл.1-6).

2.2. Матеріали експерименту

Таблиця 1

Олігонуклеотиди

Назва	Послідовність	Використано
RRP1BgRNA1 Fwd	CACCGGCCGAGATCCAA TTTGCCCAG	Клонування гідРНК
RRP1BgRNA1 Rev	AAACCTGGGCAAATTGG ATCTCGGCC	Клонування гідРНК
vector_fwd	TGACGGGGCTGCCAGCA AAAGGCCAGGAAC	Конструкції плазмідних векторів
vector_rev	CGCCCCACTATTCTGAT GCGGTATTTTCTCC	Конструкції плазмідних векторів

RP1_Pr_HA_fwd	AATACCGCATCAGAATA GTGGGGCGTGATGGCG	Конструкції плазмідних векторів
RP1_Pr_HA_rev	TGTACTCGGTCATCGCG CCCGCTGGAGCATC	Конструкції плазмідних векторів
dTag_fwd	CCAGCGGGCGCGATGAC CGAGTACAAGCCCACG	Конструкції плазмідних векторів
dTag_rev	GCATGGCGGGGGCCCCA GGGCCAGATCCGCC	Конструкції плазмідних векторів
RP1_Ds_HA_fwd	TCTGGCCCTGGGGCCCC CGCCATGCAGCCG	Конструкції плазмідних векторів
RP1_Ds_HA_rev	TGGCCTTTTGCTGGCAG CCCCGTCACGTAAAGGT G	Конструкції плазмідних векторів

Таблиця 2

Модельні об'єкти: клітинні лінії

Назва	Організм	Джерело
HeLa	Людина	ATCC, CCL-2
HCT116	Людина	ATCC, CCL-247EMT

Таблиця 3

Бактеріальні штами

Назва	Організм	Джерело
DH5α	Кишкова паличка	Thermo Fisher

Таблиця 4

Плазмідні вектори

Назва	Використано
pX459	Клонування гРНК
pGOLDEN	Клонування гомологічних послідовностей
pBAC	Експресія рамки зчитування RRP1B

Таблиця 5

Реагенти

Назва	Джерело	Використано
Plasmid MiniPrep Kit	Thermo Fisher Scientific	Виділення плазмідної ДНК високої частоти
Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific	Екстракція фрагментів ДНК високої частоти
Genomic DNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific	Виділення та очистка геномної ДНК
Phusion Green High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific	Ампліфікація ДНК
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	Білковий маркер
NuPAGE LDS Sample Buffer (4X)	Invitrogen	Підготовка зразка для поліакриламідного гелю електрофорезу
NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X)	Invitrogen	Відновлення зразків білка для електрофорезу в білковому гелі.
SuperSignal West Femto	Thermo Fisher Scientific	Виявлення низького

Maximum Sensitivity Substrate		рівня білка в фемтограмі за допомогою вестерн-блот-аналізу з ферментом пероксидазою хрому (HRP).
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific	Маркер розміру ДНК
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific	Маркер розміру ДНК
UltraPure TAE Buffer, 10X	Invitrogen	Буфер для електрофорезу
SYBR Safe DNA Gel Stain	Thermo Fisher Scientific	Барвник для візуалізації ДНК в агарозному гелі
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) w/o Calcium w/o Magnesium – L0615	Biowest	Підтримка фізіології та морфології клітин
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco	Підтримка росту клітин
Trypsin-EDTA (0.05%), phenol red	Gibco	Дисоціація клітин
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	Gibco	Підтримка росту клітин
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	New England BioLabs	Безшовне збирання декількох фрагментів ДНК
Rabbit anti-Rat IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	Invitrogen	Вторинне антитіло до антитіл вироблених в пацюках, зшите з пероксидазою для реакції візуалізації

Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	Invitrogen	Вторинне антитіло до антитіл вироблених в мишах, зшите з пероксидазою для реакції візуалізації
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	Invitrogen	Вторинне антитіло до антитіл, вироблених у кролів, зшите з пероксидазою для реакції візуалізації

Таблиця 6

Інструменти

Назва	Виробник
Центрифуга	Eppendorf (5910 R, 5424 R), Fisher Scientific (accuSpin Micro 17), VWR (Mini Star)
Вортекс	Velp Scientifica
Термо-шейкер	Eppendorf (ThermoMixer C)
ПЛР машина	ProFlex
Ваги	Struers KEBO Lab
Safe Imager™ 2.0 Blue-Light Transilluminator (Транслюмінатор синього світла)	Invitrogen
DynaMag-2 Magnet	Invitrogen
Дозатори	Gilson
Image Quant 800 GxP biomolecular imager	Amersham
ChemiDoc XRS+ System	Bio Rad

2.3. Методи дослідження

Трансформація бактерій:

Продукти реакції рестрикційної лігації або плазмиди (10 мкл), що використовуються для трансформації, зберігають на льоду до використання. Хімічно компетентні клітини *E. coli* повільно розтоплюють на льоду після того, як їх виймають з -80°C . Після розтоплення до бактерій додають ДНК і обережно перемішують перед тим, як тримати на льоду протягом 30 хвилин. Пробірки з цією сумішшю ставлять при $+42^{\circ}\text{C}$ на 90 секунд, а потім переносять на лід на 2 хвилини. Суміш переносять до кімнатної температури і вносять у пробірку 320 мкл середовища LB без антибіотиків. Потім пробірки ставлять при 37°C з обертанням на 1 годину. Тим часом планшети з LB розміщують при кімнатній температурі. Бактеріальну суспензію з пробірок розсіюють на планшетах LB і ставлять на ніч при 37°C .

Виділення плазмідної ДНК (Miniprep):

Колонії, отримані після трансформації бактерій, відбирають і переносять у рідке культуральне середовище LB для нічного росту при 37°C з обертанням. Наступного дня колонії центрифугують при 3000g протягом 10 хв. при кімнатній температурі. Виділення ДНК виконується за допомогою набору GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific™, K0502). Надлишкову рідину видаляють, а осад розбивають у Resuspension Solution (тримається при 4°C) та перемішують. Додають Lysis Solution, епіндорфи вортексують 4-6 разів. Додається Neutralization Solution, і епіндорфи вортексують 4-6 разів, перед тим як центрифугувати протягом 5 хв. при 12000 об/хв при кімнатній температурі. Надлишкова рідина переносять на Thermo Scientific GeneJET Spin Column і центрифугують протягом 1 хв. при 12000 об/хв при кімнатній температурі. Колонку промивають розчином промивання і центрифугують протягом 1 хв. при

12000 об/хв при кімнатній температурі, і зливають рідину (повторюють ці два кроки двічі в загальній складності). Порожню колонку центрифугують протягом 1 хв. при 12000 об/хв при кімнатній температурі. Колонку переносять в нову трубку, до колонки додають Elution Buffer і залишають на інкубацію 2 хв. при кімнатній температурі. Колонку центрифугують протягом 2 хв. при 12000 об/хв при кімнатній температурі, і збирають рідину (яка містить нашу ДНК). Концентрацію ДНК вимірюють за допомогою NanoDrop. Зразки можна зберігати при 4°C до використання [49].

Секвенування за Сенгером:

ДНК (близько 100 нг/мкл) додають в об'ємі 1:1 з праймерами, що цікавлять (близько 60 нг/мкл), і секвенували за Сенгером. Праймери повинні бути дуже високої чистоти, специфічними для області, що цікавить (без вторинних сайтів зв'язування і неспівпадінь), з відсотком GC в діапазоні від 40% до 60% і T_m між 55°C і 60°C.

Полімеразна ланцюгова реакція:

ПЛР Phusion:

Розчин містить буфер Phusion 5X, дНТФ (10 мМ), праймери (10 мкМ), шаблон (темплейт) ДНК (1 мкл), ДНК-полімеразу Phusion (1.25 мкл), воду (до потрібного об'єму).

ПЛР програма:

98°C - 30 сек

98°C - 10 сек

68°C - 20 сек

72°C - 30 сек

72°C - 7 хв

4°C - ∞

X 35

Електрофорез:

Агарозний гель (1%) готується з кінцевою концентрацією SYBR Safe (Invitrogen) 40X. Після завантаження зразків з додаванням забарвлювального буферу, міграція триває 30 хвилин при постійному напрузі 120V.

Екстракція ДНК із агарозного геля:

Гель вирізається якнайближче до фрагмента ДНК (для зменшення кількості геля) за допомогою чистого скальпеля. Екстракція виконується за допомогою набору для екстракції ДНК із геля GeneJET (ThermoFisher Scientific, K0691). До шматка гелю (100 мг агарози на 100 мкл буфера зв'язування) додається об'єм 1:1 буфера зв'язування. Цю суміш інкубують 10 хв. при 50°C в термошейкері (або доки гель повністю розчиниться). До 800 мкл отриманого розчину геля переносять на колонку очищення GeneJET та центрифугують протягом 1 хв. при 12,000 об/хв. Рідину видаляють, а колонку поміщають назад у той же збірний епендорф. До колонки очищення GeneJET додають 700 мкл буфера для промивання, а потім центрифугують 1 хв. при 12,000 об/хв. Рідину видаляють, а колонку поміщають назад у той же збірний епендорф, центрифугують порожню колонку 1 хвилину при 12,000 об/хв. Очищену колонку переносять в чистий мікроцентрифужний тюбик об'ємом 1,5 мл, до колонки додають 50 мкл елюційний буфер перед центрифугуванням 1 хв. при 12,000 об/хв. Колонку очищення видаляють, а очищену ДНК зберігають при -20°C до використання [50].

Метод рестрикції-лігації для гомологічних плечей:

Рестрикцію виконують за допомогою двох пар ферментів рестрикції: KpnI/SalI та XhoI/MluI. ДНК (як плазміди, так і гомологічні плечі, отримані шляхом електрофорезу після ПЛР), розведені для досягнення

концентрації 300нг/мкл та 100нг/мкл відповідно. Реакції рестрикції включають 1:1 об'єм ДНК та мастер-міксу (2X FastDigest Buffer, 5 одиниць кожного ферменту та вода). Реакції рестрикції перемішують і залишають для інкубації протягом 2 годин при 37°C. Електрофорез з продуктами рестрикції та їх очищення з геля агарози виконують згідно з методикою, представленою вище. Для лігації 1:1 мастер-міксу 2X (2X T4 DNA Ligase Buffer, 5 одиниць T4 DNA Ligase, вода) та суміші плазміда/вставка (продукти очищення з геля) інкубують при кімнатній температурі протягом 20 хв. Продукти лігації (1/8 об'єму бактерій) використовують для бактеріальної трансформації, а бактерії вирощують на середовищі з ампіциліном.

Культура клітин HeLa:

Приготувати поживне середовище із DMEM + 10% FBS + 1X PenStrep. HeLa клітини пересаджуються перед тим як заростають понад 80% поверхні. Старе середовище замінюється одним промиванням PBS, після чого клітини обробляють трипсином (Gibco™ Trypsin-EDTA (0.05%), фенольний червоний, Gibco™ 25300054) і залишають протягом 5 хвилин в інкубаторі з 5% CO₂ при 37°C (інкубатор BINDER CO₂ CB 160 з контролем O₂). Клітини розсіюють у поживному середовищі, розбавленому (1/10 для заростання 80%), і поміщають у нову посудину в інкубатор (37°C + 5% CO₂). Клітини перевіряють наступного дня, і залежно від заростання їх можна розщепити знову.

Трансфекція клітин HeLa:

Клітини HeLa висівають у пластини з шістьох комірок, щоб наступного дня досягти конфлюєнтності 50%. Наступного дня клітини трансфектують за допомогою реагентів Lipofectamine 3000. Використовуються середовище RPMI (RPMI 1640 Medium, ThermoFisher

Scientific, 21875034), реагенти Lipofectamine 3000 та P3000 (Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent, Invitrogen™, L3000015) як для контрольних, так і для експериментальних ячеек. Плазмідні розведення в середовищі RPMI перед додаванням P3000. Lipofectamine 3000 розведений в середовищі RPMI (і залишений при кімнатній температурі, перш ніж змішати з розведеними плазмідами). Змішання залишають при кімнатній температурі протягом 20 хвилин перед краплинним додаванням до клітин. Клітинам дозволяють рости протягом дня, після чого їх розщеплюють на чашці діаметром 10 см. Після 4 днів росту середовище замінюється на DMEM + антибіотик [1] (100 µg/mL: Hygromycin B, Gibco™, 10687010 або 750µg/ml Neomycin G418). Середовище змінюють щодня і до тих пір, поки всі контрольні клітини не знаходяться в апоптозі. Перед кожним оновленням середовища клітини промиваються PBS.

Лізис клітин:

Клітини HeLa Kyoto вирощують в чашці Петрі з середовищем DMEM, і 80% клітин з конфлюентних чашок використовуються для подальшого експерименту. Клітини HeLa промивають холодним PBS, клітини збирають за допомогою шпателя, після чого центрифугують з PBS, осад в PBS заморожують при -80°C до використання. Усі наступні етапи слід виконувати на льоду, і використовувані буфери повинні бути холодними. Клітини повільно тануть на льоду перед додаванням буфера лізису (20 mM Tris-HCl pH7.9, 0.5% NP-40, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10% гліцерол, 0.5 mM EDTA, pH 7.9), в якому розведено 1/100 інгібіторів протеаз, і потім суміш ставлять при +4°C протягом 1 години з обертанням. Продукт лізису центрифугують 20 хвилин при 20 000 g, і збирають супернатант. (На цьому етапі можна вимірювати концентрацію білка.)

Вестерн блот:

Для експерименту використовується 8% екстракту цілих клітин, додавши 4X loading buffer та 10X sample reducing agent. Поліакриламідний гель виставляють на роботу 55 хвилин при 180V протягом 2 годин в 1X буфері MOPS для електрофорезу (NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (20X), Invitrogen™, NP0001). Гель виставляють на напівсухий трансфер в контакті між папером Whatmann і мембраною, попередньо зануреною в буфер трансферу (склад). Трансфер відбувається при 25V протягом 2 годин. Потім мембрану поміщають в розчин з 5% напівжирного молока, розведеного в PBS-Tween (PBS 1X, Tween 0.02X) протягом 1 години за кімнатної температури або на ніч при +4°C. Після трьох послідовних промивань з PBS-T (5 хвилин - 15 хвилин - 5 хвилин) мембрану ставлять в контакт з первинним антитілом, розведеним в PBS-T в співвідношенні 1:2000, протягом 2 годин. Мембрану промивають ще тричі, перш ніж вона потрапляє в контакт з вторинним антитілом протягом 1 години за кімнатної температури або на ніч при +4°C. Проводять ще три останніх промивання в PBS-T перед виявленням мембрани за допомогою реагентів Enhanced ChemiLuminescence в ThermoFischer у співвідношенні 1:1 об'ємно.

Імунопреципітація:

Залишок отриманого лізату використовується для імунопреципітації (IP). Для одного IP використовують 25 мкл біотинованих бусин Protein G Dynabeads та антитіло за вибором (2 мкл). Бусини промивають двічі лізуючим буфером, розбивають у лізуючому буфері у співвідношенні 1:2, після чого додають антитіло, коли бусини знаходяться в суспензії. Суспензію бусин викладають на обертання при +4°C протягом 1 години. Потім бусини промивають один раз лізуючим буфером і розбивають у лізуючому буфері в співвідношенні 1:1. Лізати додають до бусин, і зразки

інкубують для імунопреципітації протягом 2 годин, обертаючи при +4°C. Лізати видаляють, бусини промивають тричі об'ємом лізуючого буфера. Потім бусини розбивають у буфері завантаження, який містить NuPAGE, і нагрівають при 95°C протягом 5 хвилин перед завантаженням в поліакриламідний гель. Подальші етапи, як і в вестерн-блот, залишаються тими ж.

Відбір одиночних клітин:

Клітини HeLa спочатку вирощуються на 10 см чашці Петрі в середовищі DMEM, після чого розбавляються до 5 клітин на лунку в зростаючому середовищі (DMEM без антибіотиків для відбору) на планшеті 96 комірок і виставляють на ріст протягом 14 днів при 37°C в інкубаторі з 0.5% CO₂, щоб в комірках були видимі чіткі окремі колонії. Відбирають 12 одиночних колоній з комірок (при цьому решта планшету 96 комірок залишається в інкубаторі як запас), старе середовище видаляється, комірки миються фосфатно-буферним розчином (PBS), перед тим як колонії обробляють трипсином протягом 10 хвилин в інкубаторі з 0,5% CO₂ при 37°C. Колонії ресуспендуються в свіжому зростаючому середовищі і поміщаються в планшет на 12 комірок, виставляючи їх для росту в інкубаторі з 0,5% CO₂ при 37°C до досягнення конфлюєнту. Як тільки клітини з колонії стають конфлюєнтними, їх розносять в новий планшет на 12 комірок (10% об'єму загальної кількості клітин), а 90% клітинної суспензії буде використовуватися для аналізу за допомогою методу вестерн-блот. Клітини центрифугуються протягом 10 хв. при 500g, промиваються один раз фосфатно-буферним розчином (PBS), і, після того як PBS видаляється, ресуспендують в буфері лізису та інгібіторах протеаз. Наступні етапи включають лізис клітин, після чого застосовуються ті ж самі протоколи, що і вище, для аналізу методом вестерн-блот.

Екстракція геномної ДНК з клітин HeLa за допомогою PureLink kit:

Клітини обробляють так, якщо б вони були розділені для клітинного росту (метод вище), і ресуспендовані (розбиті) клітини у свіжому середовищі центрифугують 5 хв. при 500g. Поживне середовище видаляють, а гранули зберігають при -20°C до використання. Наступні кроки - це кроки з набору PureLink® Геномна ДНК. Всі центрифугування та етапи проводяться при кімнатній температурі. Клітини HeLa (≤ 25 мг) додають у суміш 9/10 об'єму травного буфера та 1/10 об'єму протеїнази К та інкубують при 55°C протягом 2 годин 30 хвилин з періодичним вортексуванням. Лізат центрифугують протягом 3 хвилин при 13 000 об/хв. Надосадову рідину зберігають, додають 1/10 початкового об'єму РНКазі А і перемішують перед 2-хвилинною інкубацією. Додають початковий об'єм буфера для геномного лізису/зв'язування PureLink® і розчин перемішують вортексом, після чого додають такий самий об'єм 100% етанолу і перемішують. Лізат поміщають у спінову колонку PureLink® і центрифугують при 10000g протягом 1 хв. Спінову колонку поміщають в чисту пробірку PureLink® Collection Tube і додають 2,5 початкового об'єму промивного буфера 1 перед 1-хвилинним центрифугуванням при 10 000g. 2,5 початкового об'єму промивного буфера 2 додають до колонки перед 3-хв. центрифугуванням при 13000 g. Буфер для геномної елюції PureLink® додають до колонки, щоб отримати кінцеву концентрацію ДНК близько 60 нг/мкл, і колонку інкубують 1 хв. перед фінальним 1-хв. центрифугуванням при 13000 g. ДНК зберігають при -20°C до використання [51].

siRNA трансфекція HeLa:

Клітини HeLa (як дикий тип, так і з RRP1B, позначеним dTag) вирощуються на 6-лункових планшетах, щоб досягти 50% конфлюєнції наступного дня. Так само, як для трансфекції HeLa вектором, використовується середовище RPMI, але з іншим реагентом

Lipofectamine™ (Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent, Invitrogen™, 13778150). Реагенти Lipofectamine змішуються в співвідношенні 1:75 в RPMI і залишаються при температурі кімнати протягом 20 хвилин для адаптації. siRNA (1 мкг) розбавляють в іншому об'ємі RPMI, перед тим як обидві розчини змішуються і додаються краплями до клітин. Через 48 годин після трансфекції проводиться вестерн-блот.

Створення клітинних ліній

Сконструйовані плазмиди з RRP1B-FLAG були трансфіковані у клітини разом із векторами pBAC та експресійним вектором транспозази piggyBAC (pBASE) із використанням реагенту Lipofectamine 3000. Популяції клітин відбирали за допомогою антибіотиків пуроміцину (PURO) або бластицидину (BLAST) протягом 7–10 днів — до повної загибелі контрольних клітин. Для індукції експресії конструкцій LENG8 pBAC клітини інкубували протягом 24 годин у середовищі з додаванням 1 мг/мл доксицикліну (Sigma-Aldrich) перед збором матеріалу. Експресію конструкцій перевіряли за допомогою вестерн-блот-аналізу з використанням антитіл проти ZFC3H1 або FLAG.

Підготовка зразків для мас-спектрометрії

Усі імунопреципітації (IP) проводилися у безмітковому форматі (label-free) та у потрійних біологічних повтореннях. Клітини HeLa Kyoto, що експресують ендогенний RRP1B з N-кінцевим тегом, а також контрольні клітини HeLa Kyoto збирали відповідно до описаного протоколу. Екстракцію білків виконували з 15 мільйонів клітин на один IP, використовуючи 1 мл буфера екстракції (20 mM Tris-HCl, 1% IGEPAL, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10% гліцеролу, 0,5 mM EDTA, pH 7.9), доповненого інгібіторами протеаз (Roche).

Після короткого сонікування (3×10 с, амплітуда 1, Branson Sonifier 250) екстракти очищали центрифугуванням (20 000 gcf, 10 хв при 4°C). Магнітні частинки з антитілами до FLAG готували на основі антитіл anti-FLAG M2 (Sigma F3165), зв'язаних із кульками Dynabeads M-270 Ероху (Invitrogen). Кульки промивали тричі буфером лізису з підвищеним вмістом NaCl (до 350 мкМ).

Для обробки нуклеазою кульки ресуспендували у 40 мкл буфера екстракції з 2 мМ MgCl₂, додаючи 1 мкл Pierce Nuclease (Sigma E1014) або 1 мкл 1 мг/мл BSA, і інкубували при 25°C протягом 20 хв при струшуванні. Після промивання білки елюювали SDS-буфером (2% SDS, 100 мМ Tris pH 6.8, 10% гліцеролу) при 25°C протягом 5 хв.

Підготовку зразків для мас-спектрометрії здійснювали за процедурою Protein Aggregation Capture (PAC) з протеолітичним розщепленням на кульках MagResyn HILIC, використовуючи ферменти трипсин або хімотрипсин. Отримані пептиди очищали й концентрували на C18 stage tips перед аналізом LC-MS із використанням системи Easy nanoLC, під'єднаної безпосередньо до мас-спектрометра Thermo Scientific Orbitrap Exploris 480.

Мас-спектрометричні дані отримували в режимі Data Dependent Acquisition (DDA) та аналізували в програмі MaxQuant із увімкненими опціями “match between runs” і “Label-free quantification”. Отримані білкові групи обробляли за допомогою пакета DEP відповідно до раніше описаної методики.

Заморожування клітин:

Клітини обробляються, щоб їх розділили для росту клітин (метод вище), розбиті клітини в свіжому середовищі центрифугуються протягом 5 хвилин при 500g. Видаляється поживне середовище, а осад ресуспендують у середовищі, яке складається з 50% DMEM, 40% FBS і 10% DMSO (Sigma

Aldrich, D8418-100ML), і поміщають у кріотрубки об'ємом 1,8 мл (Nalgene™ General Long-Term Storage Cryogenic Tubes, ThermoFisher Scientific 5000-0020) протягом 24 годин при -80°C . Наступного дня клітини зберігаються при -150°C до використання.

Методика протеомного аналізу даних RRP1B за допомогою пакета DEP

Для обробки результатів мас-спектрометрії, отриманих під час дослідження білкових взаємодій RRP1B, використовувався програмний пакет DEP (Differential Enrichment analysis of Proteomics data) платформи Bioconductor (версія 1.26.0). Цей підхід забезпечує повний цикл біоінформатичного аналізу — від первинної обробки даних, експортованих із MaxQuant, до статистичного виявлення достовірно збагачених білків і побудови графічних візуалізацій.

На першому етапі було імпортовано файл proteinGroups.txt, який містив кількісні інтенсивності білкових груп для кожної репліки експериментальних і контрольних зразків. Із загального набору видалялися контамінанти, реверсні послідовності та білки з низькою частотою детекції, що могли спотворювати результати. Паралельно створювалася таблиця експериментального дизайну, яка визначала належність зразків до контрольної або IP-групи (HeLa Kyoto контроль проти HeLa Kyoto RRP1B-FLAG).

Подальша фільтрація за пропущеними значеннями дозволила залишити лише білки, детектовані щонайменше у двох із трьох біологічних повторів у кожній групі. Це гарантувало статистичну достовірність даних. Після цього проводилася нормалізація інтенсивностей за допомогою методу VSN (variance stabilization normalization), який зменшує технічну варіабельність і стабілізує дисперсію значень.

Для заповнення відсутніх значень використовувався комбінований підхід імпутації, який враховував тип пропусків. Для білків, імовірно недетектованих через низьку концентрацію, застосовувався метод MinProb, тоді як для пропусків випадкового характеру — алгоритм kNN (k-nearest neighbors). Такий підхід дозволив зберегти реалістичність кількісних співвідношень між білками.

Після підготовки даних проводився статистичний аналіз диференційного збагачення між експериментальними та контрольними умовами. Для цього використовувалася лінійна модель із корекцією за методом empirical Bayes, реалізована в пакеті limma. Для контролю рівня хибнопозитивних результатів р-значення коригували за методом Бенджаміна–Гохберга, приймаючи поріг значущості $p < 0.05$ і $|\log_2FC| \geq 1$. Отриманий список достовірно збагачених білків інтерпретувався як потенційні взаємодійні партнери RRP1B.

Завершальний етап включав візуалізацію результатів: побудову графіків типу volcano plot для демонстрації співвідношення fold-change і статистичної значущості, а також теплових карт (heatmaps), що відображали подібність експресійних профілів між реплікатами. Крім того, проводився PCA-аналіз (principal component analysis) для оцінки розділення експериментальних і контрольних груп за білковими профілями.

Таким чином, використання пакета DEP забезпечило відтворювану, статистично обґрунтовану й візуально наочну інтерпретацію протеомних даних. Отримані результати дозволили ідентифікувати низку білків, асоційованих із комплексом RRP1B, що підтвердило його участь у регуляції ядерного РНК-метаболізму та формуванні функціональних білкових комплексів, залучених у транскрипційно-посттранскрипційні процеси (Bioconductor DEP vignette, 2024).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Розробка експериментальної моделі для дослідження *RRP1B* за допомогою CRISPR-Cas9 модифікації гена *RRP1B*

Система кластерних регулярно розташованих коротких паліндромних повторів (CRISPR) – CRISPR-асоційований білок 9 (Cas9) є важливим механізмом адаптивної імунної системи прокаріотів, який дозволяє їм деградувати екзогенний генетичний матеріал. Для захисту архей та бактерій від інфікування фагами необхідні три ключові елементи: Cas9, яка є ендонуклеазою, гідовою РНК (гРНК), яка є нуклеотидною послідовністю, що містить константну ділянку довжиною 42 нуклеотиди і змінну послідовність з 20 нуклеотидів, зворотно комплементарну до потрібної послідовності ДНК-мішені, протоспейсерний мотив (PAM), який знаходиться нижче від послідовності ДНК-мішені. На першому етапі Cas9 зв'язується зі своєю гРНК, і цей комплекс шукає послідовність ДНК-мішені гРНК, розпізнаючи ділянку PAM. Потім Cas9 завдяки своїй ендонуклеазній активності генерує дволанцюговий розрив на три нуклеотиди вище PAM-сайту, витягуючи специфічну цільову послідовність. Ендогенно можуть відбуватися два механізми: Негомологічне приєднання на кінці (NHEJ), що призводить до мутацій або невеликих інсерцій/делецій, або гомологічна спрямована репарація (HDR), якщо існує шаблон репарації, який містить гомологічні послідовності, що фланкують сайт розриву. Хоча цей механізм відомий з початку 2000-х років, лише у 2012 році ця бактеріальна система стала революційним генетичним інструментом. Саме того року Еммануель Шарпантьє та Джессіка Дудна опублікували, що CRISPR-Cas9 можна програмувати за допомогою спеціальної гРНК для точного редагування генів. Це революційне відкриття відкрило нові можливості для біологічної інженерії

в різних галузях – від фундаментальної науки до терапії. На сьогоднішній день ця система є найпростішим і водночас найефективнішим методом редагування генів для вставки, видалення або навіть модифікації генів за допомогою репараційного шаблону.

3.1.1. Описання стратегії модифікації гена *RRP1B* за допомогою CRISPR-Cas9

Для досягнення необхідної модифікації гена *RRP1B* нам потрібно перенести в клітини HeLa три важливі елементи (Рис. 3.1): фермент Cas9, який буде розрізати ДНК у цікавій для нас ділянці геному; гРНК, яка доставить Cas9 до конкретного місця розрізання; репараційний шаблон, який складається з модифікованої частини гена, що цікавить нас, з додатковим тегом дТАГ, а також генотипом резистентності до селекційного антибіотику.

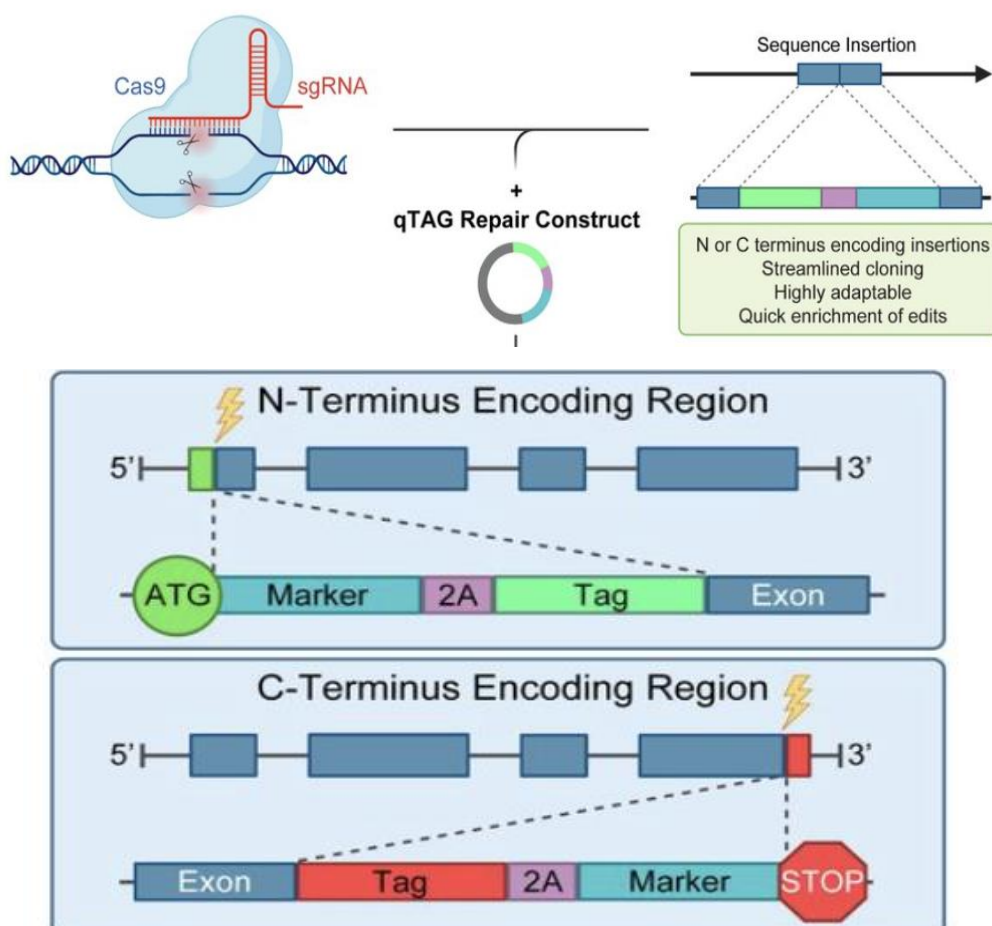


Рис. 3.1. Методологія CRISPR-Cas9 для отримання клітинних ліній HeLa Kyoto, мічених FLAG

Ці три елементи вводяться в клітини ссавців шляхом ко-трансфекції плазмідної ДНК з використанням двох типів векторів:

- pX459, що містить системи експресії Cas9 та гРНК
- pGOLDEN, що містить репараційний шаблон.

На цьому етапі метою було створення клітинних ліній HeLa, що експресують дТАГ-мічені *RRP1B* в N-кінцевому положенні (модифікований промотор гена).

Для досягнення мети було:

- Розроблено гРНК для медійованого Cas9 розщеплення ДНК в межах цікавих генів і побудовані вектори, які містять як gRNA, так і фермент Cas9.
- Сконструйовано репараційний шаблон для гомологічної рекомбінації, що містить додаткові частини, які ми хотіли вставити в ген (дТАГ-тег, маркер резистентності), і сконструйовані відповідні вектори.
- Зроблено трансфекцію клітин HeLa плазмідними векторами та проведення селекції для пошуку резистентних клітин, що несуть бажану модифікацію гена.
- Перевірено інтеграції різними методами.

3.1.2 Конструювання гРНК та клонування в pX459

Першим етапом був дизайн гРНК. Для підбору послідовності гРНК використовували безкоштовний онлайн портал <https://chopchop.cbu.uib.no/>, щоб знайти оптимальну послідовність гРНК, яка специфічно зв'язувала б ген *RRP1B* недалеко від початку кодууючої послідовності гена (Рис. 3.2).



Рис. 3.2. Фрагмент геномної послідовності гена *RRP1B* з позначеною позицією гРНК, старт кодон та плечі підібрані для гомологічної рекомбінації (див. Розділ 3.1.3.)

Потім розробили послідовності олігонуклеотидів для інтеграції у вектор рХ459. Ці комплементарні олігонуклеотиди, кодує послідовність вибраної гРНК мають кінці для реакції з спеціальним місцем в векторі що дозволяє вставити послідовність гРНК до макету гРНК в векторі за допомогою методу рестрикції та лігазної реакції (див. Методи).

На основі карти плазмідного вектору (Рис. 3.4.), замовили олігонуклеотиди (Рис.3.3.). Інтегрували їх за допомогою методів рестрикції-лігації. Потім зробили трансформацію, зібрали колонії та виділили плазмідну ДНК. Перевірили інтеграцію за допомогою секвенування з використанням праймера, специфічного до рХ459.

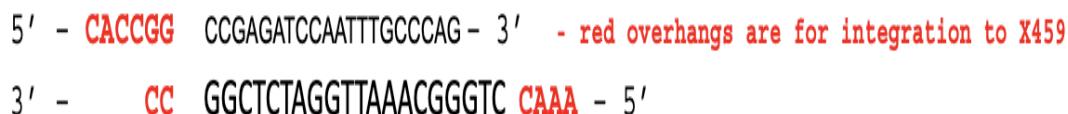


Рис. 3.3. Одноланцюгові олігонуклеотиди з кінцями для інтеграції в X459

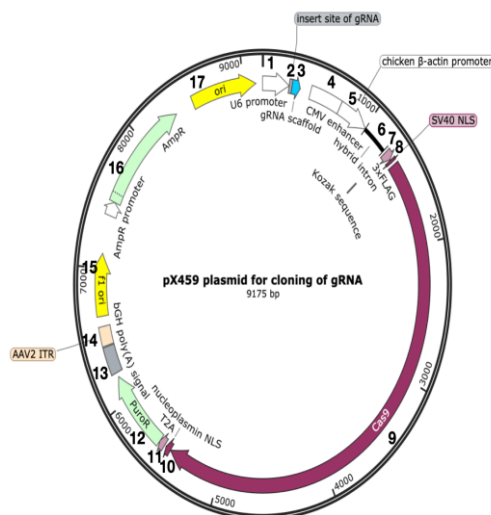


Рис. 3.4. Карта плазмідного вектору рХ459 для експресії Cas9 ензиму та гРНК

1. Промотор РНК-полімерази III для мРНК U6 людини; 2. Сайт вставки гРНК; 3. РНК-каркас для системи CRISPR/Cas9 бактерії *Streptococcus pyogenes*; 4. Ініціатор енансера негайної реакції цитомегаловірусу людини; містить видалення 18 пар основ в порівнянні зі стандартним енансером цитомегаловірусу; 5. Промотор курячого β-актина (CAG), для забезпечення високого рівня експресії генів; 6. Гібрид між інтронами курячого β-актину та мишиного вірусу маленьких розмірів; 7. Три тандемні мітки епітопів FLAG, за якими слідує сайт ентерокіназного розщеплення; 8. Сигнал ядерної локалізації великого Т-антигена SV40 (simian virus 40); 9. Ендонуклеаза Cas9 (Csn1) із системи CRISPR/Cas *Streptococcus pyogenes* Type II, генерує РНК-керовані дволанцюгові розриви ДНК; 10. Двосторонній сигнал локалізації в ядро з нуклеоплазміну; 11. 2A пептид з капсидного білка вірусу *Thosea asigna*; 12. Пуроміцин-N-ацетилтрансфераза надає стійкість до піроміцину; 13. Сигнал поліаденілювання гормону росту великої рогатої худоби; 14. Інвертований кінцевий повтор аденоасоційованого вірусу серотипу 2; 15. F1 бактеріофаг початок реплікації; Стрілка вказує напрямок синтезу (+) ланцюга; 16. В-лактамаза надає стійкість до ампіциліну, карбеніциліну та споріднених антибіотиків; 17. Сприяє створенню великої кількості копій молекули ДНК.

Після проведення реакції рестрикції та зшивання вектору рХ459 реакційний розчин був використаний для трансформації бактерій й

подальшого виділення плазмідної ДНК та секвенування для підтвердження успішної інтеграції.

3.1.3. Конструювання репараційного шаблону.

Репараційний шаблон необхідний для бажаної модифікації гена розрізаного за допомогою Cas9. Першим етапом конструювання вектора було вбудовування гомологічних ділянок білків, що цікавлять, у векторну основу. Ці гомологічні ділянки слугують шаблоном (темплейтом) для репарації ДНК на ділянці, на яку націлена гРНК, і де Cas9 розриває подвійну нитку. На Рис. 3.5. наведено карту репараційного шаблону.

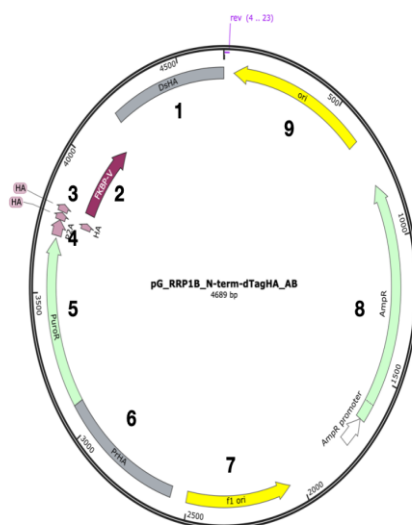


Рис. 3.5. Плазмідний вектор, що несе репараційний шаблон зі вставленими тегами та резистентністю до піроміцину:

1. Дистальне плече; 2. F36V мутант FK506-зв'язуючого білка FKBP12. Зв'язує синтетичні ліганди, які не зв'язують дикого типу FKBP; 3. НА (гемаглютинин грипу людини) епітопний тег; 4. 2A пептид з тековірусу свиней-1 поліпротеїн. Еукаріотичним рибосомам не вдається вставити пептидний зв'язок між залишками Gly і Pro, утворюючи окремі поліпептиди; 5. Пуроміцин-N-ацетилтрансфераза надає стійкість до піроміцину; 6. Проксимальне плече; 7. F1 бактеріофаг початок реплікації; Стрілка вказує напрямок синтезу (+) ланцюга; 8. В-лактамаза надає стійкість до ампіциліну, карбеніциліну та споріднених антибіотиків; 9. Сприяє створенню великої кількості

копій молекули ДНК. Вектор pGOLDEN був сконструйований завдяки NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix. Цей метод дозволяє безперешкодно збирати декілька фрагментів ДНК, незалежно від довжини фрагментів або сумісності кінців. Цей метод можна використовувати для збирання як одноланцюгових олігонуклеотидів, так і фрагментів ДНК різного розміру з різним перекриттям (15-30 п.н.).

За допомогою ПЛР з праймерами, що мають сумісні кінці, були ампліфіковані нуклеотидні ділянки (Рис.3.6): Проксимальне гомологічне плече - 518 bp (з геномної ДНК); Дистальне гомологічне плече - 492 bp (з геномної ДНК); D-Tag - 1129 bp (з вектору); Вектор - 2550 bp (з вектору); Ці фрагменти ДНК будуть використані на наступних етапах для отримання векторів, що нас цікавлять в реакції NEBuilder® HiFi DNA Assembly. Завдяки NEBuilder® HiFi DNA Assembly ми отримала плазмиду, яка містить всі фрагменти з Рис. 3.2.

Після проведення NEBuilder® HiFi DNA Assembly, реакційний розчин був використаний для трансформації бактерій й подальшого виділення плазмідної ДНК та секвенування для підтвердження успішної інтеграції.

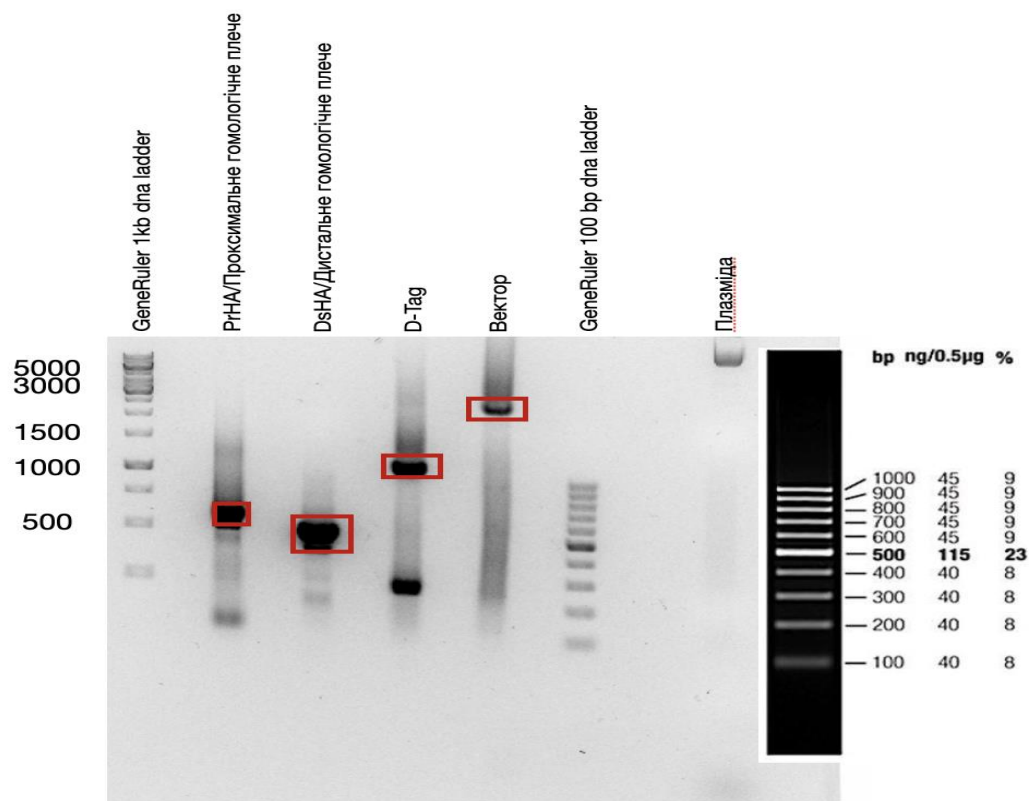


Рис. 3.6. Агарозний гель електрофорез аналіз полімеразної ланцюгової реакції для конструкції репараційного шаблону

3.1.4. Трансфекція плазмідних векторів в клітинні лінії HeLa та селекція клітин, де відбулась необхідна рекомбінація.

Обидва плазмідні вектори були трансфіковані в клітини HeLa. Через кілька днів після трансфекції (pGolden + pX459) серед трансфікованих клітин з'явилися колонії, тоді як контрольні клітини, які були трансфіковано лише з одним чи іншим вектором повністю загинули після росту на селекційному середовищі (DMEM + піроміцин (1 мг/мл)), що означає, що наш ген резистентності і, таким чином, наш власний ДНК-шаблон був інтегрований в клітини HeLa.

Щоб оцінити ефективність модифікацію гена *RRP1B*, колонії клітин HeLa тестували за допомогою ПЛР з геномної ДНК з праймерами для модифікованого фрагменту ДНК, що дозволяє визначити чи пройшла модифікація (фрагмент став довшим через вставку тегу та гена

резистентності до антибіотику) та чи було модифіковано обидві копії гена *RRP1B*.

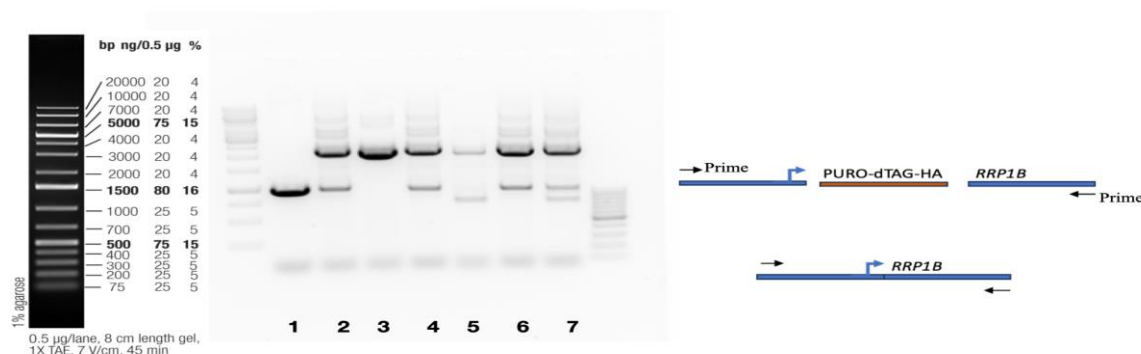


Рис. 3.7. Агарозний гель електрофорез після ампліфікації геномної ДНК з колоній клітин HeLa, що вижили після селекції з праймерами до модифікованого фрагменту гена *RRP1B*

Таким чином, колонію номер 2 з Рис. 3.7. було виділено й розмножено як нову клітинну лінію з *RRP1B* dTag.

3.1.5. Перевірка клітинної лінії.

Готову клітинну лінію було повторно верифіковано за допомогою імуноблотингу та імуофлуоресцентної мікроскопії (рис.10.). Імуноблотинг дозволяє перевірити, чи експресується білок, який нас цікавить, в даному випадку *RRP1B*, і чи є він міченим.

На рисунку 3.8.А зображений імуноблот аналізу різних клітинних ліній HeLa (1-HeLa дикого типу, 2-5 раніше модифіковані клітини HeLa з різними білками з доданими тегамі, 6- розроблена в цій роботі клітинна лінія *RRP1B*-dTag).

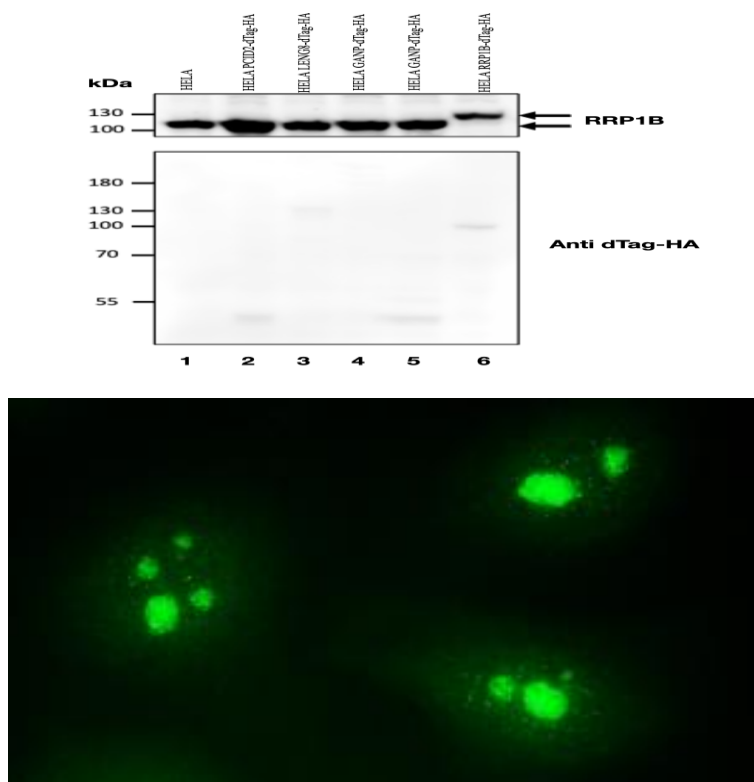


Рис. 3.8. А. Вестер-блот; Б. імунофлюоресцентна мікроскопія

На імуноблоті зверху використано антитіло до RRP1B й ми можемо бачити сигнал білка RRP1B в різних клітинах й збільшення маси білку в модифікованій клітинній лінії, що відповідає доданому тегу до маси білку RRP1B. На імуноблоті знизу відображено експресію dTag. Негативним контролем є клітинний екстракт з WT HeLa Kyoto (1), і на ньому не видно жодної смуги бо в ній нема цього тегу. В різних клітинних ліній можна побачити білки різного розміру з dTag тегом. Клітинна лінія вироблена в процесі цієї роботи має сигнал dTag на рівні 130 kDa що є відома маса RRP1B плюс маса dTag тегу.

На Рис. 3.8Б. модифіковані клітини виготовлені в ході цієї роботи та забарвлені антитілом до RRP1B показують, що модифікований білок знаходиться в ядерці, ця локалізація відповідає нативному білку. Це говорить що локалізація й функції не були пошкоджені доданням тегу до білку.

Підсумовуючи, було успішно згенеровано клітинні лінії, що експерсують білок RRP1B з ектопічними тегами - продукт модифікованого гена *RRP1B* для подальших досліджень, в тому числі аналізу білок-білкових взаємодій.

3.1.6. Проведення мас-спектрометрії

Іммунопреципітацію було проведено як вказано вище в розділі №. 2. Після етапу імунопреципітації білкові комплекси готували до мас-спектрометричного аналізу. Осаджені білки піддавали триптичному або хімотриптичному розщепленню, а отримані пептиди очищували на C18-стейдж-тіпах для видалення солей та залишкових реагентів. Очищені зразки завантажували на систему нанорідинної хроматографії, сполучену з мас-спектрометром Orbitrap Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific).

Аналіз проводили в режимі Data-Dependent Acquisition (DDA), який забезпечує фрагментацію найбільш інтенсивних іонів для подальшої ідентифікації білків. Обробку даних здійснювали за допомогою MaxQuant із використанням бази UniProt Homo sapiens, з активованими функціями Match between runs та Label-free quantification (LFQ) (Cox & Mann, 2008).

Подальший статистичний аналіз виконували в середовищі R із застосуванням пакета DEP, що дозволяє виявляти достовірно збагачені білки між експериментальними та контрольними зразками (Zhang et al., 2018). До подальшої інтерпретації включали білки з fold change >10 та $p < 0.01$, що свідчило про надійність виявлених білкових взаємодій.

3.1.7 Результати мас-спектрометричного аналізу

Після обробки мас-спектрометричних даних за допомогою програм MaxQuant та DEP було побудовано вулканоподібний графік (volcano plot), який відображає достовірність та ступінь змін у кількості білків між

експериментальною (RRP1B_WT-FLAG) та контрольною групами (HeLa Kyoto без FLAG-тега) (рис 3.9).

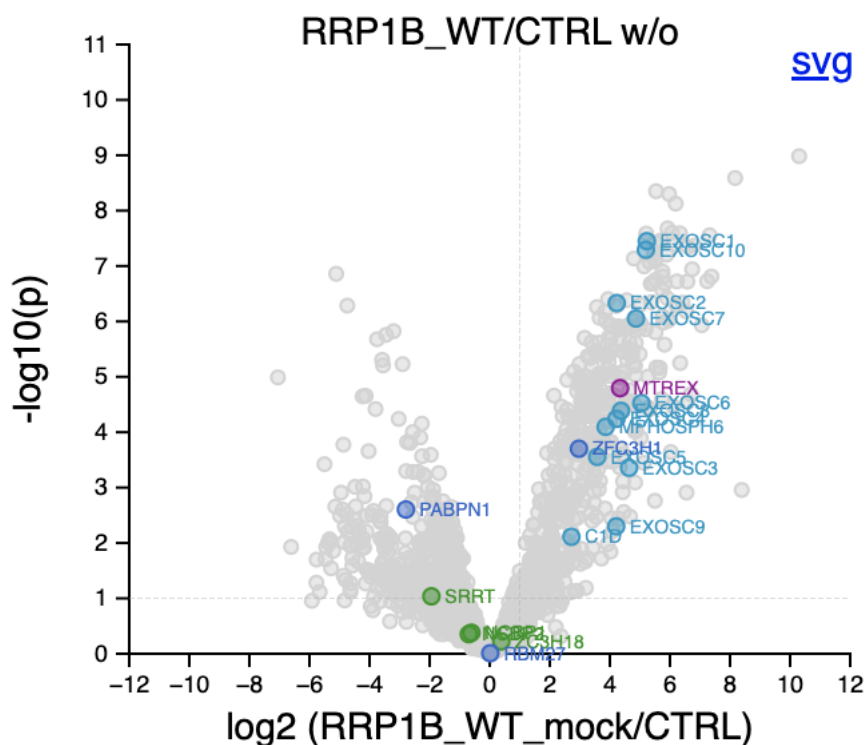


Рис. 3.9. Вулканоподібний графік результатів мас-спектрометричного аналізу, що демонструє порівняння рівнів збагачення білків між експериментальною (RRP1B_WT-FLAG) та контрольною групами (HeLa Kyoto без FLAG-тега). По осі X наведено логарифмоване співвідношення ($\log_2$ fold change) рівнів білків, а по осі Y — статистичну значущість змін ($-\log_{10}$ p-value).

Вісь X ($\log_2$ fold change) відображає відношення рівня збагачення білків у клітинах, що експресують RRP1B-FLAG, порівняно з контролем. Позитивні значення $\log_2$ свідчать про білки, які були збагачені у зразку RRP1B_WT, тобто потенційні партнери взаємодії з RRP1B. Негативні значення, навпаки, позначають білки, які зустрічаються переважно у контрольних клітинах або не мають специфічної асоціації з досліджуваним білком.

Вісь Y ($-\log_{10}$ p-value) демонструє статистичну значущість відмінностей: чим вище розташована точка, тим більш достовірною є різниця у рівнях білка між

експериментальною та контрольною вибірками. Точки, розташовані у правій верхній частині графіка, відповідають білкам, достовірно збагаченим у зразку RRP1B-FLAG.

Контрольна група (HeLa Kyoto без FLAG) використовувалася для виключення білків, які неспецифічно зв'язуються з матрицею або антитілами. Таким чином, отримані результати підтверджують специфічну асоціацію RRP1B із компонентами PAXT-комплексу, що забезпечує деградацію надлишкових ядерних транскриптів.

3.1.8. Біоінформатичний аналіз білкових взаємодій

Для функціональної інтерпретації результатів мас-спектрометричного аналізу було проведено біоінформатичний аналіз усього набору ідентифікованих білків (~700), збагачених у зразку RRP1B_WT-FLAG порівняно з контрольною лінією HeLa Kyoto без FLAG-тега. Для узагальнення результатів усі білки було впорядковано за значенням fold change та статистичною достовірністю (p-value). Для подальшої деталізації обрано 50 білків із найвищими показниками збагачення (fold change > 6), що, ймовірно, представляють найбільш стабільні або функціонально значущі взаємодії з RRP1B (Табл. 7).

Таблиця 7

Перелік білків, ідентифікованих у зразку RRP1B_WT, що демонструють підвищене збагачення порівняно з контролем, та їхні коефіцієнти збагачення

№	Білок	Fold change	№	Білок	Fold change
1	RRP1B	10.3	26	ISG20L2	5.97
2	DDX50	8.39	27	USP36	5.97
3	DDX54	8.17	28	PAK1IP1	5.95
4	WDR74	7.38	29	REXO4	5.92
5	DDX24	7.32	30	RPL36	5.91
6	RPF2	7.24	31	RPF1	5.89
7	BRIX1	7.06	32	RPL7L1	5.83

8	NOP14	6.81	33	LENG8	5.82
9	DDX56	6.74	34	NOC3L	5.78
10	RPL36A	6.7	35	NSA2	5.76
11	FBLL1	6.6	36	DDX10	5.76
12	PPAN	6.58	37	MAK16	5.75
13	NPM3	6.58	38	GNL3	5.75
14	RPL29	6.55	39	PWP1	5.73
15	DDX27	6.53	40	NGDN	5.69
16	ZNF106	6.42	41	RSL24D1	5.66
17	H1FX	6.34	42	UTP3	5.64
18	RRS1	6.33	43	RSL1D1	5.55
19	FTSJ3	6.23	44	NOC4L	5.54
20	RRP1	6.21	45	ABT1	5.52
21	CEBPZ	6.19	46	RBM28	5.52
22	MYBBP1A	6.16	47	PCID2	5.51
23	EBNA1BP2	6.11	48	GLYR1	5.51
24	KIAA0020	6.07	49	NOC2L	5.51
25	SURF6	6.03	50	RRP8	5.32

Серед ідентифікованих у результаті IP-MS білків виявлено кілька добре охарактеризованих партнерів RRP1B, що узгоджується з попередніми даними літератури. Зокрема, ZC3H18 та PABPN1 — відомі компоненти PAXT-комплексу, який забезпечує деградацію надлишкових або дефектних ядерних РНК. До цього ж функціонального кластера належать білки екзосомного комплексу EXOSC3 та EXOSC10, що беруть участь у контролі якості транскриптів і підтриманні ядерного РНК-гомеостазу.

Цікаво, що окремі з цих білків, зокрема ZC3H18 і PABPN1, були раніше описані як фактори, пов'язані з порушеннями експресії генів у клітинах раку молочної залози. Їхня наявність серед збагачених партнерів RRP1B не лише

підтверджує специфічність експерименту, але й підкреслює потенційну роль RRP1B у регуляції транскрипційних і посттранскрипційних процесів, що беруть участь у пухлинній прогресії.

Отриманий набір білків було завантажено у бази Gene Ontology (GO) та Enrichr для визначення їх субклітинної локалізації, функціональної анотації, участі у біологічних процесах і можливих асоціацій із патологічними станами. Аналіз за категорією GO Cellular Component показав, що більшість білків мають ядерну локалізацію та належать до двох основних груп — нуклеолярних (GO:0005730) і нуклеоплазматичних (GO:0005654).

До нуклеолярних білків, які беруть участь у біогенезі рибосом і процесингу пре-рРНК, належать: NSA2, NOC4L, WDR74, NOP14, EBNA1BP2, NGDN, RRP1, MAK16, UTP3, RPF1. Ці білки формують функціональні кластери, пов'язані з формуванням великої субодиниці рибосоми, асемблеєю пре-рРНК і підтриманням структурної організації ядерця.

Нуклеоплазматичні білки — CEBPZ, USP36, RRS1, GLYR1, GNL3, REXO4, FBLL1, ZNF106, SURF6, MYBBP1A — беруть участь у деградації надлишкових транскриптів, регуляції альтернативного сплайсингу та контролі стабільності РНК. Деякі з них, такі як USP36 і CEBPZ, також асоціюються з регуляцією клітинного циклу та пухлинною прогресією.

Аналіз у вкладках Pathways та Diseases/Drugs бази Enrichr продемонстрував збагачення білків у шляхах, пов'язаних із метаболізмом РНК, ядерним транспортом, контролем якості транскриптів і канцерогенезом. Ці результати узгоджуються з припущенням, що RRP1B виконує інтегративну роль у підтриманні ядерного РНК-гомеостазу, поєднуючи структурні процеси в ядерці з регуляторними механізмами у нуклеоплазмі, а також може бути залучений у молекулярні механізми пухлинної прогресії.

GO-аналіз підтвердив, що білки, які взаємодіють із RRP1B, формують взаємопов'язану мережу, об'єднану спільними біологічними процесами — рибосомним біогенезом, ядерним транспортом РНК, контролем якості транскриптів і посттранскрипційною регуляцією експресії генів. Такий функціональний розподіл свідчить про інтегративну роль RRP1B у підтриманні ядерного РНК-гомеостазу, що поєднує структурні процеси в ядерці з регуляторними механізмами в нуклеоплазмі.

3.1.9 Результати функціональної класифікації білків

Для наочного представлення результатів функціонального аналізу білків, асоційованих із RRP1B, було побудовано графік (рис. 3.10), що відображає статистичну достовірність збагачення певних термінів Gene Ontology (категорія Cellular Component).

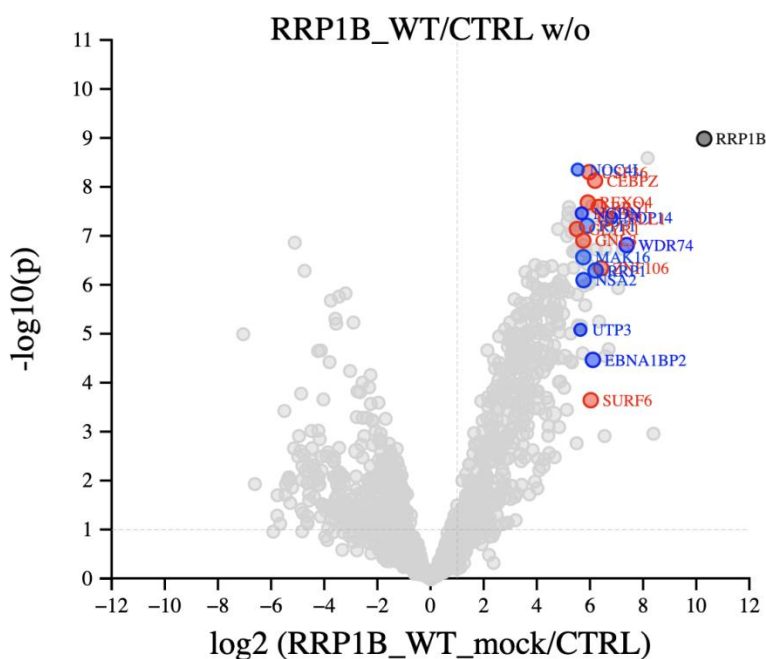


Рисунок 3.10. Розподіл білків, асоційованих із RRP1B, за субклітинними компонентами відповідно до GO-аналізу. Синім кольором позначено нуклеоларні білки, залучені у процеси біогенезу рибосом і процесингу пре-рРНК; червоним — нуклеоплазматичні білки, пов'язані з регуляцією посттранскрипційних процесів, деградацією РНК та альтернативним сплайсингом.

На графіку показано, що найбільше збагачення спостерігається для білків, локалізованих у ядерці (nucleolus, GO:0005730), а також у структурах, пов'язаних із прерибосомальними комплексами (preribosome, large/small subunit precursor, GO:0030686; GO:0030687).

Це вказує, що значна частина білків, ідентифікованих у зразку RRP1B_WT, бере участь у процесингу пре-рРНК і збиранні рибосомних субодиниць.

Другим за ступенем збагачення є кластер, що відповідає білкам нуклеоплазми (nucleoplasm, GO:0005654). До цієї групи належать фактори, пов'язані з транскрипційним контролем, альтернативним сплайсингом та деградацією надлишкових РНК-транскриптів, серед яких CEBPZ, GLYR1, RRP1B та REXO4.

Загалом, отримані дані підтверджують подвійний характер функціональної активності RRP1B: з одного боку, він взаємодіє зі структурними компонентами ядерця, пов'язаними з біогенезом рибосом, а з іншого — з нуклеоплазматичними факторами, що регулюють РНК-метаболізм і стабільність транскриптів.

3.1.10 Характеристика білків, асоційованих із RRP1B

Для детального аналізу білкових взаємодій, виявлених у зразку RRP1B_WT, було відібрано 20 найбільш репрезентативних білків, що належать до двох основних функціональних груп — нуклеолярних і нуклеоплазматичних.

Нуклеолярні білки представлені факторами, які беруть участь у біогенезі рибосом і процесингу пре-рРНК, тоді як нуклеоплазматичні білки залучені у посттранскрипційні процеси, зокрема у деградацію РНК, альтернативний сплайсинг, транскрипційну регуляцію та контроль стабільності ядерних транскриптів.

Нуклеолярні білки:

1. NSA2 (Nuclear Protein Family Member 2)

NSA2 — ядерцевий білок, який відіграє ключову роль у біогенезі великої (60S) субодиниці рибосоми. За даними UniProt та Gene Ontology (GO), NSA2 бере участь у дозріванні пре-рибосомних частинок і контролі якості їх складання, забезпечуючи правильне формування рибосом у клітинному ядрі.

GO-аналіз (GO:0005730 — nucleolus; GO:0042254 — ribosome biogenesis) підтверджує ядерцеву локалізацію білка та його залучення до біогенезу рибосом. У базі Enrichr NSA2 асоціюється із біологічними процесами «ribosomal large subunit assembly», «rRNA processing» і «nucleolar organization», що свідчить про його участь у дозріванні пре-рРНК і підтриманні структурної організації ядерця.

За даними Human Protein Atlas, NSA2 експресується переважно в ядрах клітин, з концентрацією у ядерцевій області. Білок функціонує як складова мультибілкових комплексів, необхідних для утворення пре-60S рибосомних частинок, і має вплив на регуляцію клітинного циклу через контроль біогенезу рибосом.

Функціональний контекст NSA2 у взаємодіях з RRP1B свідчить про залучення обох білків до спільних процесів у ядерці — формування рибосомної структури, процесингу рРНК і підтримання рибосомального гомеостазу. Таким чином, NSA2 виступає як маркер активності ядерця, який підкреслює структурну компоненту функцій RRP1B у ядрі клітини.

Щодо клінічних асоціацій, підвищена експресія NSA2 спостерігалася в умовах метаболічного стресу, зокрема при діабетичній нефропатії, а також згадується у зв'язку з деякими ендокринними й неврологічними патологіями. Хоча прямих доказів участі NSA2 в онкогенезі (зокрема у раку молочної залози) наразі небагато, його роль у контролі рибосомного біогенезу та клітинного росту робить цей білок

потенційним кандидатом для подальших досліджень у контексті пухлинної трансформації.

2. NOC4L (Nucleolar Complex Protein 4-Like)

NOC4L — ядерцевий білок, який належить до сімейства CBF/MAK21 і виконує важливу роль у біогенезі рибосом. Він бере участь у процесингу рРНК і формуванні субодиниць рибосоми, забезпечуючи правильне складання рибосомних частинок у ядерці.

Функціонально NOC4L належить до білків, що мають РНК-зв'язувальну активність, і асоціюється з біологічними процесами «rRNA processing» та «ribosome biogenesis». Його основна локалізація — ядерце та нуклеоплазма, де він бере участь у формуванні прерибосомних комплексів і контролі дозрівання великої субодиниці рибосоми.

NOC4L функціонує як структурний компонент ядерцевих білкових кластерів, що забезпечують синтез і стабільність рибосомної РНК. У контексті взаємодії з RRP1B цей білок може бути частиною структурної гілки мережі білків, пов'язаної з формуванням і дозріванням пре-рРНК.

Хоча прямих експериментальних доказів участі NOC4L у розвитку онкологічних захворювань поки недостатньо, відомо, що порушення процесів рибосомного біогенезу, у яких він задіяний, часто асоціюються з неконтрольованим клітинним ростом і трансформацією, що робить NOC4L потенційним маркером порушень у системі синтезу рибосом, характерних для ракових клітин.

3. WDR74 (WD Repeat Domain 74)

WDR74 — це ядерцевий білок, що містить WD-повторювані мотиви, які забезпечують стабільні білок-білкові взаємодії в багатокомпонентних рибосомних комплексах. Його основна функція полягає в процесингу пре-рРНК та формуванні великої (60S) субодиниці рибосоми.

Експериментальні дослідження показали, що нокаут або зниження рівня експресії WDR74 призводить до значного пригнічення росту клітин,

дезорганізації ядерцевих структур і зниження синтезу рРНК. WDR74 тісно пов'язаний із білками, що беруть участь у дозріванні рибосомних частинок, включно з RRP1B, RRP1 і BRIX1. Ці білки функціонують як складові ядерцевих комплексів, відповідальних за процесинг пре-рРНК, стабілізацію рибосомних проміжних частинок та їх транспорт у цитоплазму.

Згідно з даними функціональної анотації Gene Ontology, WDR74 залучений до біологічних процесів «ribosome biogenesis» (GO:0042254), «rRNA processing» (GO:0006364) та «nucleolus organization» (GO:0005730). Високий рівень експресії WDR74 спостерігається в активно проліферуючих клітинах, що узгоджується з його роллю у забезпеченні інтенсивного білкового синтезу.

У контексті патологій, підвищена експресія WDR74 виявлена при ряді злоякісних новоутворень, зокрема у раку легені, печінки та колоректальному раку, де вона корелює з агресивним фенотипом пухлинних клітин. Таким чином, WDR74 може розглядатися як потенційний маркер порушеного рибосомного біогенезу, що є характерною рисою багатьох типів раку, та як можливий елемент сигнальної мережі, у якій функціонує RRP1B.

4. NOP14 (Nucleolar Protein 14)

NOP14 — ядерцевий білок, що є одним із ключових компонентів процесому — великого рибонуклеопротейдного комплексу, який забезпечує дозрівання пре-рРНК і формування малої (40S) рибосомної субодиниці. Його основна функція полягає в утворенні 18S рРНК, необхідної для правильного складання рибосом і підтримання білкового синтезу в клітині.

NOP14 локалізується переважно у фібрилярному центрі ядерця, де асоціюється з фібрилярином, NOP56, NOP58 та іншими білками комплексу snoRNP, які беруть участь у модифікації та процесингу пре-

рРНК. У клітинах ссавців NOP14 виконує роль структурного стабілізатора процесому, сприяючи правильній організації рРНК-матриці.

Функціональні GO-анотації вказують на залучення NOP14 до процесів «rRNA processing» (GO:0006364), «ribosome biogenesis» (GO:0042254) і «nucleolus organization» (GO:0005730). Його експресія підвищується в клітинах із високою проліферативною активністю — наприклад, у тканинах пухлин, що підтверджує його важливість у регуляції клітинного росту.

Підвищена експресія NOP14 відзначена при деяких видах раку, включаючи рак підшлункової залози, меланому та рак молочної залози, де вона корелює з посиленням проліферативного потенціалу клітин. Це робить NOP14 потенційним біомаркером активного рибосомного біогенезу й можливою мішенню для вивчення у зв'язку з функцією RRP1B, який також бере участь у формуванні рРНК-залежних комплексів і може виступати ко-регулятором цих процесів у ядерці.

5. EBNA1BP2 (EBNA1 Binding Protein 2)

EBNA1BP2 — це ядерцевий білок, який відіграє важливу роль у біогенезі великої (60S) рибосомної субодиниці в еукаріотичних клітинах. Спочатку він був ідентифікований як білок, що зв'язується з вірусним фактором EBNA1 (Epstein-Barr Nuclear Antigen 1), однак подальші дослідження показали його фундаментальну участь у клітинних процесах, незалежних від вірусної інфекції.

EBNA1BP2 локалізується переважно у ядерці, де взаємодіє з білками комплексу дозрівання рибосом, зокрема з RRP1, BRX1, MAK16 та RPF2. Ці взаємодії забезпечують процесинг 5.8S та 28S рРНК, а також правильне формування 60S субодиниці рибосоми. Функціональні анотації Gene Ontology вказують на його участь у біологічних процесах «rRNA processing» (GO:0006364), «ribosomal large subunit biogenesis» (GO:0042273) і «nucleolus organization» (GO:0005730).

Дослідження показують, що EBNA1BP2 має критичне значення для виживання клітин з високою проліферативною активністю, оскільки дефіцит цього білка призводить до порушення ядерцевої морфології, зниження рівня рибосомного біогенезу та зупинки клітинного циклу в фазі G1. У контексті патологій надмірна активність EBNA1BP2 може сприяти підвищенню синтетичної здатності клітин, що є характерною ознакою пухлинного росту.

Його виявлення серед білків, асоційованих із RRP1B, підтверджує функціональну пов'язаність цих двох факторів у межах нуклеолярного рибосомного шляху. Обидва білки, ймовірно, беруть участь у регуляції дозрівання пре-рРНК та формуванні стабільних рибосомних субодиниць, що має ключове значення для підтримання клітинної гомеостазу та може бути критичним при онкогенній трансформації клітин.

6. NGDN (Neuroguidin)

NGDN — це еволюційно консервативний білок, що локалізується переважно у ядерці, але може частково розподілятися і в нуклеоплазмі. Його основна функція пов'язана з біогенезом великої (60S) рибосомної субодиниці, зокрема з процесингом пре-рРНК і дозріванням рибосомних частинок.

У клітинах ссавців NGDN функціонує як компонент ядерцевого комплексу разом із білками RRP1, BRIX1, NSA2 і MAK16, які беруть участь у ранніх етапах складання пре-60S рибосомної субодиниці. Його активність критично важлива для підтримання рівня зрілої рРНК та стабільності рибосомних проміжних частинок.

Аналіз за Gene Ontology показує, що NGDN бере участь у процесах «ribosome biogenesis» (GO:0042254), «rRNA processing» (GO:0006364) і «nucleolus organization» (GO:0005730). Крім того, NGDN може брати участь у регуляції стабільності мРНК через взаємодію з білками, які

контролюють посттранскрипційні процеси, що створює потенційний зв'язок між рибосомним біогенезом і РНК-контролем.

Деякі дослідження свідчать, що порушення експресії NGDN може впливати на проліферацію клітин і чутливість до стресових факторів. Хоча пряма асоціація NGDN із конкретними онкологічними патологіями ще недостатньо вивчена, підвищений рівень його експресії спостерігається в клітинах із високою метаболічною активністю, що може свідчити про його потенційну роль у підтриманні інтенсивного білкового синтезу в пухлинних клітинах.

Його взаємодія з RRP1 і, опосередковано, з RRP1B свідчить про участь NGDN у спільних ядерцевих процесах, пов'язаних із контролем стабільності пре-рРНК і формуванням функціональних рибосомних субодиниць.

7. RRP1 (Ribosomal RNA Processing Protein 1)

RRP1 — це ядерцевий білок, який бере участь у дозріванні 28S і 5.8S рРНК, а також у складанні великої (60S) субодиниці рибосоми. Його функція тісно пов'язана з процесами обробки пре-рРНК і стабілізацією проміжних рибонуклеопротейдних комплексів у ядерці.

RRP1 є найближчим гомологом білка RRP1B, із яким має високий рівень структурної подібності, зокрема у N-кінцевій ділянці, що містить NOP52-домен — ключовий для зв'язування з компонентами рибосомного біогенезу. Водночас RRP1 має коротший C-кінцевий домен і відсутню низку регуляторних мотивів, які у RRP1B залучені до транскрипційного контролю та взаємодій із білками нуклеоплазми.

Таким чином, можна вважати, що RRP1 виконує основну (еволюційно первинну) функцію у біогенезі рРНК, тоді як RRP1B, зберігаючи ці властивості, набула додаткових регуляторних функцій, пов'язаних із посттранскрипційними механізмами та стабільністю ядерних РНК. Існують припущення, що обидва білки можуть брати участь в одних

і тих же ядерцевих комплексах одночасно або навіть формувати гетеродимери, забезпечуючи узгоджену роботу структурних і регуляторних компонентів у процесах рибосомного біогенезу.

Виявлення RRP1 серед партнерів RRP1B у мас-спектрометричному аналізі підтверджує їхню функціональну спорідненість і можливу кооперацію в межах єдиних рибосоמוутворювальних або РНК-залежних комплексів у ядрі клітини.

8. MAK16 (MAK16 Homolog)

MAK16 — еволюційно консервативний ядерцевий білок, який є ключовим компонентом у процесі біогенезу великої (60S) рибосомної субодиниці. Його функції збереглися від дріжджів до людини, що підкреслює його фундаментальне значення для клітинного росту та проліферації.

MAK16 входить до складу рибонуклеопротейдних комплексів, які регулюють ранні етапи складання пре-рРНК у ядерці. Він взаємодіє з білками RPF1 і BRIX1, утворюючи стабільний функціональний комплекс, який бере участь у процесингу пре-рРНК та формуванні зрілих рибосомних частинок. Порушення експресії або нокаут MAK16 призводить до накопичення незрілих форм 60S субодиниці, що супроводжується дезорганізацією ядерцевої структури та зниженням ефективності білкового синтезу.

Анотації Gene Ontology вказують на участь MAK16 у процесах «ribosome biogenesis» (GO:0042254), «rRNA processing» (GO:0006364), «nucleolus organization» (GO:0005730) та «ribonucleoprotein complex assembly» (GO:0022618).

MAK16 відіграє критичну роль у підтриманні структурної цілісності ядерця — центру синтезу рРНК. Деякі дослідження свідчать, що MAK16 може брати участь у регуляції клітинного циклу через вплив на швидкість синтезу рибосом. Висока експресія MAK16 спостерігається у клітинах із

підвищеною метаболічною активністю, що може бути характерно для пухлинних клітин.

Ймовірно, RRP1B може опосередковано впливати на активність MAK16 через регуляцію складу ядерцевих білкових комплексів, забезпечуючи узгоджене функціонування рибосомного біогенезу з посттранскрипційними механізмами контролю РНК.

9. UTP3 (U Three Protein 3)

UTP3 — це білок ядерцевої локалізації, який входить до складу малого субкомплексу SSU-processome, відповідального за дозрівання 18S рРНК і формування малої (40S) субодиниці рибосоми. Його присутність є критичною для ранніх етапів рибосомного біогенезу, зокрема для розщеплення пре-рРНК у сайтах A0, A1 та A2.

UTP3 тісно взаємодіє з білками NOP14, UTP14A, а також із факторами, залежними від малих ядерцевих РНК (snoRNA), що забезпечують правильну орієнтацію та модифікацію пре-рРНК. Білок локалізується переважно у фібрилярному центрі ядерця, де бере участь у формуванні рибонуклеопротейдних комплексів і структурній організації процесому.

За даними Gene Ontology, UTP3 пов'язаний із процесами «ribosome biogenesis» (GO:0042254), «rRNA processing» (GO:0006364) і «small ribosomal subunit assembly» (GO:0000028). Порушення функції UTP3 призводить до дефектів у дозріванні 18S рРНК, що, своєю чергою, викликає зниження ефективності білкового синтезу та проліферації клітин.

Хоча UTP3 традиційно асоціюється з процесами пре-рРНК, деякі дослідження вказують на його можливу участь у посттранскрипційних механізмах регуляції. Є дані про потенційну взаємодію UTP3 із факторами, які контролюють стабільність і деградацію ядерних транскриптів — процеси, в яких також залучений RRP1B. Це може

свідчити про функціональний зв'язок між структурними механізмами формування рибосом та регуляцією РНК-гомеостазу в ядрі клітини.

10. RPF1 (Ribosome Production Factor 1)

RPF1 — це білок ядерцевої локалізації, який виконує ключову роль у формуванні великої (60S) субодиниці рибосоми. Він є важливим компонентом BRIX-комплексу, який бере участь у процесингу рРНК і складанні рибосомних частинок у ядерці.

RPF1 взаємодіє з білками MAK16, BRIX1 і RRS1, утворюючи функціональну платформу, що координує асоціацію рибосомних білків і контроль правильного дозрівання пре-рРНК. Цей комплекс забезпечує стабільність рибонуклеопротейдних проміжних частинок і запобігає накопиченню нефункціональних форм 60S субодиниці.

Функціональні категорії Gene Ontology відносять RPF1 до процесів «ribosome biogenesis» (GO:0042254), «rRNA processing» (GO:0006364) та «large ribosomal subunit assembly» (GO:0000027). Порушення експресії RPF1 викликає затримку дозрівання 60S субодиниці та зміни морфології ядерця.

У клітинах, що швидко діляться, рівень експресії RPF1 значно підвищується, що свідчить про його участь у забезпеченні високої швидкості білкового синтезу, необхідної для проліферації. Цей факт набуває особливого значення у контексті онкології, оскільки надмірна активність рибосомного біогенезу є однією з ознак ракових клітин.

Зважаючи на функціональні зв'язки RPF1 із білками, асоційованими з RRP1B (такими як MAK16 і BRIX1), можна припустити, що цей білок є частиною спільного регуляторного механізму, спрямованого на підтримання рибосомного гомеостазу. У цьому контексті RPF1 може виступати структурним партнером, який стабілізує комплекси, у складі яких RRP1B виконує регуляторні функції, поєднуючи біогенез рибосом із ширшими процесами РНК-метаболізму.

Нуклеоплазматичні білки:

1. CEBPZ (ССААТ/Enhancer Binding Protein Zeta)

CEBPZ — це транскрипційний фактор, який зв'язується з промоторними послідовностями, що містять мотив ССААТ, і бере участь у регуляції експресії широкого спектра генів, пов'язаних із клітинним ростом, апоптозом, відповіді на стрес та диференціацією.

CEBPZ локалізується переважно в нуклеоплазмі, де функціонує як модифікатор хроматину, здатний взаємодіяти з гістоновими ацетилтрансферазами (НАTs), такими як p300/CBP. Завдяки цим взаємодіям CEBPZ сприяє активації транскрипції шляхом ремоделювання хроматину та підвищення доступності ДНК для транскрипційних комплексів.

За даними Gene Ontology, білок бере участь у процесах «regulation of transcription, DNA-templated» (GO:0006355), «chromatin organization» (GO:0006325) і «positive regulation of RNA polymerase II transcription» (GO:0045944). Його активність має вирішальне значення для підтримання транскрипційного балансу клітини, особливо під час стресових або проліферативних станів.

Порушення регуляції CEBPZ асоціюється з низкою патологій, зокрема лейкоміями та раком молочної залози, де спостерігається підвищення його експресії або зміна локалізації. У таких випадках він може виступати як коактиватор онкогенних програм, впливаючи на експресію генів клітинного циклу.

Потенційна асоціація CEBPZ із RRP1B може відображати перехресний зв'язок між транскрипційною регуляцією та посттранскрипційною обробкою РНК. Обидва білки беруть участь у підтриманні стабільності ядерного транскриптома, що свідчить про можливе функціональне узгодження між процесами транскрипції, сплайсингу та деградації РНК у клітинному ядрі.

2. USP36 (Ubiquitin-Specific Peptidase 36)

USP36 — це деубіквітинуючий фермент, який локалізується переважно в ядерці, але також виявляється в нуклеоплазмі. Він відіграє ключову роль у регуляції стабільності білків, що беруть участь у процесингу рибосомальної РНК, біогенезі рибосом і контролі клітинного росту.

USP36 функціонує як деубіквітинуюча протеаза, що знімає мітки убіквітину з цільових білків, запобігаючи їхній деградації. Серед його відомих мішеней — фібрилярин (FBL), який бере участь у модифікаціях пре-рРНК, та онкоген MYC, стабільність якого безпосередньо залежить від активності USP36. Таким чином, USP36 підтримує рівновагу між білковим синтезом і деградацією у ядрі, впливаючи як на структурні, так і на регуляторні процеси клітини.

За даними Gene Ontology, USP36 залучений до процесів біогенезу рибосом, деубіквітинування білків, процесингу рРНК і регуляції проліферації клітин. Порушення його функції має суттєві патологічні наслідки. Надекспресія USP36 описана при раку молочної залози, яєчників і гепатоцелюлярній карциномі, де він стабілізує MYC і сприяє проліферації пухлинних клітин. Натомість інактивація USP36 призводить до порушення біогенезу рибосом, нуклеолярного стресу та активації апоптозу.

Ймовірна взаємодія USP36 із RRP1B може бути пов'язана з контролем стабільності білкових комплексів, задіяних у процесингу РНК. Зокрема, USP36 може регулювати склад і динаміку PAXT-комплексу, відповідального за деградацію надлишкових ядерних транскриптів. Така взаємодія вказує на існування зв'язку між посттрансляційними модифікаціями білків і посттранскрипційною регуляцією РНК, що є ключовим механізмом підтримання ядерного гомеостазу та запобігання трансформації клітин.

3. RRS1 (Ribosome Biogenesis Regulatory Protein Homolog)

RRS1 — це багатofункціональний білок, який відіграє важливу роль у збиранні великої (60S) субодиниці рибосоми. Основна його функція полягає у забезпеченні правильного приєднання рибосомальних білків до пре-60S частинок, що є ключовим етапом дозрівання рибосомної РНК.

У клітинах людини RRS1 утворює стабільний комплекс із RPF2, який бере участь у транспортуванні пре-рРНК та регуляції взаємодії з білками BRIX1, RPL5 і RPL11. Такий комплекс сприяє утворенню функціонально зрілої 60S субодиниці рибосоми та забезпечує точність рибосомального біогенезу.

Хоча RRS1 головним чином локалізується в ядерці, його також виявляють у нуклеоплазмі, де він може брати участь у регуляції експорту пре-рРНК і транскрипційній координації. Цей білок виконує своєрідну “зв’язувальну” роль між структурними процесами рибосомного складання та регуляцією експресії генів.

Його функціональна взаємодія з RRP1B може відображати інтеграцію механізмів рибосомного біогенезу з більш широкими ядерними процесами, такими як посттранскрипційна обробка РНК і контроль стабільності транскриптів. Ці білки, ймовірно, можуть діяти узгоджено, забезпечуючи структурну й функціональну координацію між ядром і нуклеоплазмою.

Порушення функції RRS1 призводить до дефектів рибосомного біогенезу, нуклеолярного стресу й активації p53-залежного шляху. Крім того, підвищена експресія RRS1 описана при гепатоцелюлярній карциномі, раку молочної залози та мозкових гліомах, що свідчить про його потенційну роль у підтриманні пухлинного росту через вплив на синтез білка та клітинну проліферацію..

4. GLYR1 (Glyoxylate Reductase 1 Homolog)

GLYR1 — це нуклеоплазматичний білок із двофункціональною активністю: він діє як NADH-залежна дегідрогеназа і водночас виконує регуляторну роль у транскрипції. Основна його функція полягає в підтриманні окисно-відновного балансу в ядрі та модифікації хроматину, що впливає на експресію генів, пов'язаних із клітинною диференціацією, проліферацією та реакцією на стрес.

GLYR1 має здатність зв'язуватися з гістоновими білками H3K36me3, що дозволяє йому впливати на архітектуру хроматину та регулювати транскрипційну активність. Крім того, цей білок може утворювати білково-білкові комплекси з транскрипційними факторами, зокрема з CEBPZ, а також з компонентами, залученими до посттранскрипційного контролю РНК. Завдяки цим властивостям GLYR1 виступає посередником між структурною організацією хроматину та механізмами стабілізації мРНК у нуклеоплазмі.

За даними GO-аналізу, GLYR1 бере участь у процесах «chromatin organization» (GO:0006325), «regulation of transcription, DNA-templated» (GO:0006355), «response to oxidative stress» (GO:0006979) і «RNA metabolic process» (GO:0016070).

Порушення експресії GLYR1 має клінічне значення — зниження його рівня спостерігається при раку молочної залози, яєчників і легенів, де це корелює з агресивнішим перебігом пухлин. У той же час, надекспресія GLYR1 може посилювати стійкість клітин до стресу та сприяти пухлинній виживаності через підтримання гомеостазу РНК і транскрипційної стабільності.

Присутність GLYR1 серед RRP1B-асоційованих білків вказує на можливий зв'язок між транскрипційними подіями та посттранскрипційною стабілізацією РНК. Це узгоджується з моделлю, за якою RRP1B може координувати функції хроматинових факторів і білків РНК-метаболізму в межах єдиної регуляторної мережі нуклеоплазми.

5. GNL3 (Guanine Nucleotide-Binding Protein-Like 3 / Nucleostemin)

GNL3 — це ядерний GTP-зв'язуючий білок, відомий також як нуклеостемін, який відіграє ключову роль у регуляції проліферації клітин, підтриманні стовбурового потенціалу та контролі клітинного циклу.

GNL3 локалізується переважно у нуклеоплазмі та ядерці, де динамічно перерозподіляється залежно від фази клітинного циклу. У фазі росту він накопичується в ядерці, тоді як під час стресових умов або пошкодження ДНК переміщується до нуклеоплазми. Така поведінка вказує на його функціональну гнучкість у відповіді на зміни клітинного стану.

Функціонально GNL3 взаємодіє з низкою білків, зокрема MDM2, p53, RSL1D1 і NPM1, контролюючи стабільність p53 та запобігаючи передчасному апоптозу. Крім того, він залучений у підтримання теломерної стабільності через взаємодію з білками комплексу shelterin, що забезпечує захист геномної цілісності.

За даними GO-аналізу, GNL3 бере участь у процесах «ribosome biogenesis» (GO:0042254), «cell cycle regulation» (GO:0051726), «telomere maintenance» (GO:0000723) і «response to DNA damage stimulus» (GO:0006974).

З точки зору патології, надекспресія GNL3 виявляється при раку молочної залози, легенів, простати та гліомах, де вона корелює з підвищеною проліферацією клітин і резистентністю до апоптозу. Високий рівень GNL3 асоційований із гіршим прогнозом і агресивнішими формами пухлин.

Ймовірна взаємодія GNL3 з RRP1B може бути зумовлена їхньою спільною участю в підтриманні структурної організації ядра, контролі транскрипційної активності та регуляції стабільності РНК-транскриптів у відповідь на стресові сигнали. Таким чином, обидва білки можуть

виступати компонентами інтегративної регуляторної системи, яка координує ріст клітин, біогенез рибосом і реакцію на геномні ушкодження.

6. REXO4 (RNA Exonuclease 4)

REXO4 — це ядерна 3'→5' екзонуклеаза, яка бере участь у деградації дефектних або надлишкових РНК-транскриптів у нуклеоплазмі, забезпечуючи контроль якості процесингу пре-мРНК. Її основна функція полягає в усуненні нефункціональних транскриптів, що запобігає їх накопиченню та потенційному утворенню токсичних РНК-продуктів.

REXO4 є структурно й функціонально пов'язаною з ядерним екзосомним комплексом, який здійснює деградацію РНК у ядрі. Цей білок бере участь у механізмах RNA surveillance, спрямованих на забезпечення точності транскрипційних і посттранскрипційних процесів. За даними GO-аналізу, REXO4 залучений до процесів «RNA catabolic process» (GO:0006401), «mRNA surveillance pathway» (GO:0071028) і «nuclear RNA degradation» (GO:0006396).

Його функціональна взаємодія з RRP1B є логічною, оскільки обидва білки беруть участь у підтриманні ядерного РНК-гомеостазу. RRP1B може діяти як платформа для рекрутування екзосомних компонентів, включно з REXO4, у межах PAXT-комплексу, що відповідає за деградацію поліаденільованих РНК-транскриптів, які не пройшли повний процесинг.

Порушення функції REXO4 призводить до накопичення дефектних РНК і активації стресових шляхів, що може впливати на геномну стабільність і клітинний цикл. Дослідження вказують, що зміни експресії REXO4 спостерігаються при ряді онкологічних захворювань, зокрема раку молочної залози та легенів, де дисбаланс РНК-деградації може сприяти підвищеній експресії онкогенних транскриптів.

Таким чином, REXO4 виступає ключовим елементом у PAXT-залежній регуляторній мережі, у якій RRP1B виконує координуючу

функцію, поєднуючи транскрипційні події з механізмами деградації ядерних РНК для підтримання функціональної стабільності клітини.

7. FBLL1 (Fibrillar-like Protein 1)

FBLL1 — це білок, структурно подібний до фібрилярину (FBL), основного ферменту метилювання рибосомних РНК. FBLL1 виконує подібні функції, беручи участь у процесінгу пре-рРНК та модифікації малих ядерних РНК (snoRNA), що є важливими для правильного дозрівання рибосомних субодиниць.

Хоча основна локалізація FBLL1 — ядерце, він також виявляється в нуклеоплазмі, де може регулювати динаміку складання snoRNP-комплексів і взаємодіяти з іншими факторами метаболізму РНК. FBLL1 бере участь у 2'-О-метилюванні рРНК, забезпечуючи структурну стабільність і функціональну активність рибосом.

За результатами GO-аналізу, FBLL1 асоційований із процесами «rRNA processing» (GO:0006364), «snoRNA metabolic process» (GO:0034470) та «methylation» (GO:0032259). Така функціональна характеристика підтверджує його роль у підтриманні точності й ефективності рибосомного біогенезу.

Ймовірна взаємодія FBLL1 з RRP1B має регуляторне значення: RRP1B може координувати функцію FBLL1 у межах ядерних білкових комплексів, що поєднують рибосомний біогенез і посттранскрипційну обробку РНК. Завдяки цьому забезпечується узгодженість між структурними та регуляторними процесами в ядрі клітини.

Дослідження свідчать, що дисбаланс експресії FBLL1 може бути пов'язаний із пухлинною прогресією, зокрема при раку молочної залози та легенів, де порушення метилювання РНК веде до змін у синтезі білків і підвищеної клітинної проліферації. Отже, FBLL1 може виступати молекулярним посередником між рибосомним біогенезом і онкогенними механізмами, у яких бере участь RRP1B.

8. ZNF106 (Zinc Finger Protein 106)

ZNF106 — це великий нуклеоплазматичний білок, який містить множинні цинкові пальці типу C2H2, що забезпечують його здатність до зв'язування з ДНК, РНК і білками. Він виконує регуляторну роль у транскрипції та посттранскрипційній обробці РНК, діючи як посередник між транскрипційними факторами та сплайсосомними комплексами.

ZNF106 взаємодіє з низкою факторів сплайсингу (зокрема SRSF і hnRNP-білками), контролюючи альтернативний сплайсинг у відповідь на клітинні сигнали, такі як стрес або зміни метаболічного стану. Крім того, цей білок бере участь у регуляції стабільності мРНК через зв'язування з їхніми 3'-UTR-областями.

За результатами GO-аналізу, ZNF106 асоційований із процесами «RNA splicing» (GO:0008380), «regulation of gene expression» (GO:0010468) і «mRNA stabilization» (GO:0043488), що підкреслює його участь у посттранскрипційній регуляції експресії генів.

Його потенційна взаємодія з RRP1B узгоджується з роллю обох білків у регуляції транскрипційно-посттранскрипційного зв'язку. RRP1B може забезпечувати структурну платформу для рекрутування таких факторів, як ZNF106, до ядерних комплексів контролю РНК. Це вказує на спільну участь у підтриманні стабільності транскриптома та регуляції експресії генів у нуклеоплазмі.

Крім того, ZNF106 має клінічне значення: його надекспресія спостерігається при раку молочної залози, простати та підшлункової залози, де вона корелює з активацією сигнальних шляхів PI3K/AKT і NF-κB, що стимулюють клітинну проліферацію. Це робить ZNF106 потенційним регулятором онкогенних транскрипційних програм, у яких RRP1B може відігравати модулюючу роль.

9. SURF6 (Surfeit Locus Protein 6)

SURF6 — це еволюційно консервативний білок, який локалізується на межі ядерця й нуклеоплазми та виконує роль структурного і регуляторного компонента у формуванні рибонуклеопротейнових комплексів (RNP). SURF6 здатний зв'язувати як РНК, так і білки snoRNP-комплексів, беручи участь у процесінгу пре-рРНК, модифікаціях 2'-О-метилування та складанні рибосомних субодиниць.

Функціонально SURF6 розглядається як “мостовий” білок, який забезпечує координацію між нуклеолярними процесами рибосомного біогенезу та нуклеоплазматичними шляхами обробки РНК. Така проміжна локалізація дозволяє SURF6 інтегрувати сигнали між структурними зонами ядра, зокрема сприяти транспорту зрілих рибосомних частинок до цитоплазми.

GO-аналіз підтверджує участь SURF6 у таких процесах, як «rRNA processing» (GO:0006364), «ribosome biogenesis» (GO:0042254), «RNA binding» (GO:0003723) та «nucleolar organization» (GO:0005730). Це свідчить про його важливу роль у підтриманні функціональної архітектури ядерця.

Виявлення SURF6 серед білків, асоційованих із RRP1B, є логічним, оскільки обидва білки беруть участь у підтриманні ядерного РНК-гомеостазу. RRP1B, який локалізується як у ядерці, так і в нуклеоплазмі, може координувати активність SURF6 у процесах дозрівання рРНК і деградації надлишкових транскриптів. Таким чином, SURF6 виступає потенційним посередником між структурними (нуклеолярними) та регуляторними (нуклеоплазматичними) функціями в клітинному ядрі.

Крім того, зміни експресії SURF6 виявлені у клітинах раку молочної залози та гліобластоми, де підвищена активність білка корелює з інтенсивним рибосомним біогенезом і підтримкою проліферативного потенціалу пухлинних клітин, що додатково підкреслює його можливий внесок у патогенез пухлин у зв'язку з RRP1B.

10. MYBBP1A (Myb-Binding Protein 1A)

MYBBP1A (Myb-Binding Protein 1A) — багатофункціональний нуклеоплазматичний білок, який виконує ключову роль у транскрипційній регуляції, контролі клітинного циклу та відповіді на стрес. Первинно описаний як білок, що зв'язується з транскрипційним фактором c-Myb, MYBBP1A впливає на експресію генів, пов'язаних із проліферацією, диференціацією та апоптозом клітин.

Білок локалізується переважно у нуклеоплазмі, проте під дією клітинного стресу може переміщуватись у ядро, де бере участь у регуляції біогенезу рибосом. MYBBP1A взаємодіє з такими факторами, як P53, NF- κ B і PARP1, що визначає його залучення до механізмів репарації ДНК, апоптозу й регуляції клітинного метаболізму. Він також здатний інгібувати активність онкогенних білків c-Myb і RelA/p65, виконуючи функцію потенційного супресора пухлинного росту.

Функціональні дослідження показують, що MYBBP1A бере участь у регуляції транскрипції, процесах рибосомного біогенезу, а також у негативному контролі проліферації клітин. Його зв'язок із RRP1B може бути опосередкований участю обох білків у координації транскрипційних і посттранскрипційних процесів, особливо за умов стресу або онкогенного стимулу. Як і RRP1B, MYBBP1A функціонує на межі між структурними та регуляторними механізмами ядра, забезпечуючи підтримання стабільності транскриптома.

З клінічної точки зору, знижена експресія MYBBP1A спостерігається при раку молочної залози, нирковоклітинному та колоректальному раку, де її дефіцит пов'язаний із підвищеною агресивністю пухлинного процесу та гіршим прогнозом. Це дозволяє розглядати MYBBP1A як важливий супресор пухлин і потенційного партнера RRP1B у регуляції ядерного гомеостазу та запобіганні канцерогенезу.

Отримані результати демонструють, що білки, асоційовані з RRP1B, формують кілька функціональних комплексів, зокрема процесому, комплекси великої субодиниці рибосоми, екзосомний та РАХТ-комплекси, а також білки, пов'язані зі сплайсингом і транскрипційною регуляцією. Такий розподіл підтверджує, що RRP1B виступає інтегративним фактором між структурними та регуляторними механізмами ядра, координуючи процеси біогенезу рибосом, обробки РНК і контролю якості транскриптів.

ВИСНОВКИ

На основі проведеного експериментального та біоінформатичного дослідження було розроблено комплексну модель аналізу білкових взаємодій гена *RRP1B*, що поєднує методи клітинної інженерії, імунопреципітації та мас-спектрометрії з сучасними алгоритмами протеомного аналізу.

1. Створено експериментальну систему на основі клітинної лінії HeLa Kyoto, у якій білок RRP1B було ендегенно позначено FLAG-тегом. Такий підхід забезпечив нативний рівень експресії білка без порушення внутрішньоклітинної регуляції.

2. Проведено серію IP-MS експериментів, які дозволили ідентифікувати понад тисячу білків, серед яких було визначено 50 найбільш значуще збагачених у зразку RRP1B_WT-FLAG порівняно з контролем.

3. За допомогою програм MaxQuant і DEP виконано кількісну обробку спектральних даних, побудовано вулканоподібні графіки та визначено статистично достовірні білки-партнери.

4. Біоінформатичний GO-аналіз показав, що більшість ідентифікованих білків належить до двох основних функціональних груп:

- нуклеолярних, залучених до біогенезу рРНК та складання рибосом;
- нуклеоплазматичних, які беруть участь у деградації надлишкових транскриптів і контролі стабільності мРНК.

5. Сформовано перелік із 20 ключових білків, асоційованих із RRP1B, серед яких визначено компоненти ядерного екзосомного комплексу (EXOSC2–EXOSC10), білки RRP1, MAK16, RPF1, NSA2, NOP14, NOC4L, залучені у біогенез рибосом, а також регуляторні фактори

CEBPZ, USP36, GLYR1, REXO4, GNL3, ZNF106, що беруть участь у контролі якості транскриптів, деградації РНК та транскрипційній регуляції.

Аналіз за базами GO та Enrichr показав, що ідентифіковані білки формують функціональні комплекси, пов'язані з процесом екзосоми, РАХТ-комплексом та факторами сплайсингу, що забезпечують зв'язок між синтезом, дозріванням і деградацією РНК у ядрі клітини.

Отримані результати дозволяють висунути гіпотезу, що RRP1B виконує інтегративну роль у координації рибосомного (рРНК) та мРНК-шляхів метаболізму, поєднуючи функції структурних компонентів ядерця з регуляторними механізмами контролю якості РНК у нуклеоплазмі.

Подальші дослідження, зокрема створення нокаут-моделей RRP1B та аналіз його взаємодій з компонентами екзосоми та РАХТ-комплексу, дадуть змогу з'ясувати, чи дійсно цей білок виступає координаційною ланкою між процесами дозрівання рРНК і деградації надлишкових мРНК у ядрі клітини.

Таким чином, у роботі було не лише підтверджено участь RRP1B у біогенезі рибосом, але й розширено уявлення про його функції як регулятора посттранскрипційних процесів, що відкриває нові підходи до вивчення ролі цього білка в онкогенезі.

Обмеження дослідження

Дослідження проводилося на одній клітинній моделі (HeLa Kyoto), що обмежує можливість узагальнення результатів на інші типи клітин.

Метод label-free IP-MS, хоч і зберігає нативність білкових комплексів, може мати нижчу точність порівняно з ізотопно міченими системами.

Унаслідок обмеженої чутливості мас-спектрометрії деякі білки з низькою експресією або слабкими взаємодіями могли не бути детектовані.

Біоінформатична інтерпретація базувалася на актуальних базах даних (Gene Ontology, Enrichr, UniProt), проте оновлення анотацій може призвести до уточнення отриманих функціональних висновків.

Подальші напрями досліджень

Поглиблений функціональний аналіз RRP1B — дослідження його ролі в регуляції сплайсингу та стабільності ядерних транскриптів за допомогою RNA-seq у клітинах із нокаутом RRP1B.

Порівняння протеомних профілів RRP1B у різних клітинних моделях (у тому числі пухлинних клітинах молочної залози) для з'ясування контекстозалежних білкових взаємодій.

Використання ізотопно мічених підходів (TMT, SILAC) для точнішої кількісної оцінки білкових комплексів.

Валідація виявлених взаємодій методами ко-імунопреципітації та мікроскопії для підтвердження локалізації білків у ядерці та нуклеоплазмі.

Інтеграція протеомних і транскриптомних даних для побудови цілісної моделі регуляції РНК-гомеостазу.

Оцінка клінічної значущості RRP1B — аналіз зв'язку його експресії з метастатичним потенціалом пухлинних клітин і прогнозом онкологічних захворювань.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Bentley DL. Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nat Rev Genet.* 2014;15(3):163-175.
2. Ule J, Blencowe BJ. Alternative splicing regulatory networks: functions, mechanisms, and evolution. *Mol Cell.* 2019;76(2):329-345.
3. Lee SC, Abdel-Wahab O. Therapeutic targeting of splicing in cancer. *Nat Med.* 2016;22(9):976-986.
4. Roeder RG. 50+ years of eukaryotic transcription: an expanding universe of factors and mechanisms. *Nat Struct Mol Biol.* 2019;26(9):783-791.
5. Cramer P. Organization and regulation of gene transcription. *Nature.* 2019;573(7772):45-54.
6. Bradner JE, Hnisz D, Young RA. Transcriptional addiction in cancer. *Cell.* 2017;168(4):629-643.
7. Whyte WA, Orlando DA, Hnisz D, Abraham BJ, Lin CY, Kagey MH, Rahl PB, Lee TI, Young RA. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell.* 2013 Apr 11;153(2):307-319. doi: 10.1016/j.cell.2013.03.035. PMID: 23582322; PMCID: PMC3653129.
8. Wahl MC, Will CL, Lührmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell.* 2009;136(4):701-718.
9. Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet.* 2008;40(12):1413-1415.
10. Oltean S, Bates DO. Hallmarks of alternative splicing in cancer. *Oncogene.* 2014;33(46):5311-5318.
11. Climente-González H, Porta-Pardo E, Godzik A, Eyras E. The functional impact of alternative splicing in cancer. *Cell Rep.* 2017;20(9):2215-2226.
12. Lee SC, Abdel-Wahab O. Therapeutic targeting of splicing in cancer. *Nat Med.* 2016;22(9):976-986.

- 13.Colgan DF, Manley JL. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev.* 1997;11(21):2755-2766.
- 14.Tian B, Manley JL. Alternative polyadenylation of mRNA precursors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(1):18-30.
- 15.Kilchert C, Wittmann S, Vasiljeva L. The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(4):227-239.
- 16.Schmid M, Jensen TH. Transcription-associated quality control of mRNP. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2018;1861(1):67-75.
- 17.Popp MW, Maquat LE. Leveraging rules of nonsense-mediated mRNA decay for genome engineering and personalized medicine. *Cell.* 2016 Jun 2;165(6):1319-1322. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.053. PMID: 27259145; PMCID: PMC4924582.
- 18.Natalizio BJ, Wentz SR. Postage for the messenger: designating routes for nuclear mRNA export. *Trends Cell Biol.* 2013;23(8):365-373.
- 19.Stewart M. Polyadenylation and nuclear export of mRNAs. *J Biol Chem.* 2019;294(9):2977-2987. doi: 10.1074/jbc.REV118.002810. PMID: 30683695; PMCID: PMC6398009.
- 20.Fasken MB, Corbett AH. Mechanisms of nuclear mRNA quality control. *RNA Biol.* 2009;6(3):237-241. doi: 10.4161/rna.6.3.8330. PMID: 19574733; PMCID: PMC2801993.
21. Hutten S, Kehlenbach RH. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends Cell Biol.* 2007;17(4):193–201. doi: 10.1016/j.tcb.2007.02.003. PMID: 17317185.
- 22.McMahon M, Contreras A, Ruggero D. Small RNAs with big implications: new insights into H/ACA snoRNA function and their role in human disease. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2015 Mar-Apr;6(2):173-189. doi: 10.1002/wrna.1266. PMID: 25363811; PMCID: PMC4390053.

- 23.Schmitt AM, Chang HY. Long noncoding RNAs in cancer pathways. *Cancer Cell*. 2016 Apr 11;29(4):452-463. doi:10.1016/j.ccell.2016.03.010. PMID: 27070700; PMCID: PMC4831138.
- 24.Matera AG, Terns RM, Terns MP. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Mar;8(3):209-220. doi:10.1038/nrm2124. PMID: 17318225.
- 25.Sveen A, Kilpinen S, Ruusulehto A, Lothe RA, Skotheim RI. Aberrant RNA splicing in cancer; expression changes and driver mutations of splicing factor genes. *Oncogene*. 2016;35(19):2413-2427. doi:10.1038/onc.2015.318. PMID: 26300000
- 26.Dvinge H, Kim E, Abdel-Wahab O, Bradley RK. RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(7):413-430. doi: 10.1038/nrc.2016.51. PMID: 27282250; PMCID: PMC5094465
- 27.Nagase T., Seki N., Ishikawa K., Tanaka A., Nomura N. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. V. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0161-KIAA0200) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1. *DNA Res*. 1996. **3**: 17—24. PMID 8724849 DOI:10.1093/dnares/3.1.17
- 28.https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000160208;r=21:43659560-43696079. Ensembl випуск 111 - січень 2024 © Г. EMBL-EBI
- 29.<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RRP1B>
- 30.Lee M, Dworkin A.M, Gildea D, Trivedi N.S; NISC Comparative Sequencing Program; Moorhead GB, Crawford NP. RRP1B is a metastasis modifier that regulates the expression of alternative mRNA isoforms through interactions with SRSF1. *Oncogene*. 2014 Apr 3;33(14):1818-27. doi: 10.1038/onc.2013.133. Epub. 2014 Apr 22. PMID: 23604122; PMCID: PMC3925194.

- 31.Srivastava G, Bajaj R, Kumar G.S, Gaudreau-Lapierre A, Nicolas H, Chamousset D, Kreitler D, Peti W, Trinkle-Mulcahy L, Page R. The ribosomal RNA processing 1B:protein phosphatase 1 holoenzyme reveals non-canonical PP1 interaction motifs. *Cell Rep.* 2022. 41(9):111726. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111726. PMID: 36450254; PMCID: PMC9813921.
- 32.Crawford NP, Yang H, Mattaini KR, Hunter KW. The metastasis efficiency modifier ribosomal RNA processing 1 homolog B (RRP1B) is a chromatin-associated factor. *J Biol Chem.* 2009 Oct 16;284(42):28660-28673. doi: 10.1074/jbc.M109.023457. PMID: 19710015; PMCID: PMC2781410.
- 33.Crawford NP, Qian X, Ziogas A, Papageorge AG, Boersma BJ, Walker RC, Lukes L, Rowe WL, Zhang J, Ambs S, Lowy DR, Anton-Culver H, Hunter KW. Rrp1B, a new candidate susceptibility gene for breast cancer progression and metastasis. *PLoS Genet.* 2007 Nov;3(11):e214. doi: 10.1371/journal.pgen.0030214. PMID: 18081427; PMCID: PMC2098807.
- 34.Silla T, Karadoulama E, Mąkosa D, Lubas M, Jensen TH. The RNA exosome adaptor ZFC3H1 functionally competes with nuclear export activity to retain target transcripts. *Cell Rep.* 2018 May 15;23(7):2199-2210. doi:10.1016/j.celrep.2018.04.061. PMID: 29768216; PMCID: PMC5972229.
- 35.Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature.* 2016 Sep 15;537(7620):347-355. doi:10.1038/nature19949. PMID: 27629641.
- 36.Collins FS, Varmus H. A new initiative on precision medicine. *N Engl J Med.* 2015 Feb 26;372(9):793-795. doi:10.1056/NEJMp1500523. PMID: 25635347.
- 37.Zhang B, Wang J, Wang X, Zhu J, Liu Q, Shi Z, et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2014;513(7518):382-387. doi:10.1038/nature13438.
- 38.Hanash SM, Baik CS, Kallioniemi O. Emerging molecular biomarkers — blood-based strategies to detect and monitor cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011 Apr;8(3):142-150. doi:10.1038/nrclinonc.2010.220. PMID:21364687.

39. Aronson SJ, Rehm HL. Building the foundation for genomics in precision medicine. *Nature*. 2015;526(7573):336-342. doi:10.1038/nature15816.
40. Creative Proteomics. IP-MS Data Analysis. [Internet]. [place unknown]: Creative Proteomics; [date unknown]. Available from: <https://www.creative-proteomics.com/resource/ip-ms-data-analysis.htm>
41. Stelzl U, Wanker EE. The value of high quality protein-protein interaction networks for systems biology. *Curr Opin Chem Biol*. 2006 Dec;10(6):551-558. doi:10.1016/j.cbpa.2006.10.005. PMID: 17055769.
42. Keilhauer EC, Hein MY, Mann M. Accurate protein complex retrieval by affinity enrichment mass spectrometry (AE-MS) rather than affinity purification mass spectrometry (AP-MS). *Proteomics*. 2015 Mar;15(15):4106-4113. doi:10.1002/pmic.201400517. PMID: 25596222.
43. Einhauer A, Jungbauer A. The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J Biochem Biophys Methods*. 2001 Oct 30;49(1-3):455-465. doi:10.1016/S0165-022X(01)00213-5. PMID: 11694294.
44. Keilhauer EC, Hein MY, Mann M. AP-MS and IP-MS: experimental design, data analysis, and interpretation. *Proteomics*. 2015 Mar;15(5-6):1113-1126. doi:10.1002/pmic.201400472. PMID: 25430008.
45. Mellacheruvu D, Wright Z, Couzens AL, Lambert JP, St-Denis NA, Li T, et al. The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification–mass spectrometry data. *Nat Methods*. 2013 Aug;10(8):730-736. doi:10.1038/nmeth.2557. PMID: 23921808; PMCID: PMC3773500.
46. Cox J, Hein MY, Lubner CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics*. 2014 Sep;13(9):2513-2526. doi:10.1074/mcp.M113.031591.
47. Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc*. 2016 Dec;11(12):2301-2319. doi:10.1038/nprot.2016.136.

48. Atramentova LO, Utevska OM. Statystychni metody v biolohii. Kharkiv: KhNU imeni V. N. Karazina; 2007 (In Ukrainian).
49. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012655_GeneJET_Plasmid_Miniprep_UG.pdf
50. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_man.pdf
51. https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012661_GeneJET_Gel_Extraction_UG.pdf

АНОТАЦІЯ

Робота присвячена дослідженню білкових взаємодій гена RRP1B, який відіграє важливу роль у ядерному РНК-метаболізмі та може бути залучений у механізми пухлинної прогресії. Метою роботи було проаналізувати функціональну роль RRP1B у клітинах людини шляхом виявлення його білкових партнерів за допомогою методів протеоміки.

У дослідженні використано сучасні підходи: створення клітинної лінії HeLa Kyoto з ендегенним FLAG-міченим RRP1B, імунопреципітацію, мас-спектрометрію (IP-MS), кількісний аналіз у MaxQuant та DEP, а також біоінформатичні інструменти Gene Ontology та Enrichr. Отримані результати дозволили ідентифікувати білкові комплекси, пов'язані з біогенезом рРНК та контролем якості РНК, що свідчить про інтегративну роль RRP1B у регуляції ядерних РНК-процесів.

Ключові слова: CRISPR-Cas9, клітинні лінії, ген *RRP1B*, метаболізм нуклеїнових кислот, протеоміка, імунопреципітація.

SUMMARY

This thesis is devoted to the investigation of protein interactions of the RRP1B gene, which plays an important role in nuclear RNA metabolism and may be involved in mechanisms of tumor progression. The aim of the study was to analyze the functional role of RRP1B in human cells by identifying its protein partners using proteomic approaches.

The research employed modern experimental methods, including the generation of a HeLa Kyoto cell line with endogenously FLAG-tagged RRP1B, immunoprecipitation coupled with mass spectrometry (IP-MS), quantitative proteomic analysis using MaxQuant and the DEP package, as well as bioinformatic tools such as Gene Ontology and Enrichr. The obtained results

enabled the identification of protein complexes associated with rRNA biogenesis and RNA quality control, highlighting the integrative role of RRP1B in the regulation of nuclear RNA-processing pathways.

Keywords: CRISPR-Cas9, cell lines, gene *RRP1B*, nucleic acid metabolism, proteomics, immunoprecipitation.