

## ABSTRACT

Ribosomal proteins (RPs) are a family of proteins that, together with rRNAs, constitute the ribosomal subunits involved in protein biosynthesis. As it was traditionally believed to only play a role in ribosomal biogenesis, RPs have remained largely unexplored until studies from the past few decades revealed the extra-ribosomal roles of RPs, particularly in the tumorigenesis of various cancers. Relative to other well-studied cancers such as breast, lung and colorectal carcinomas, RP research on nasopharyngeal carcinoma (NPC), in particular, received a lesser extent of global attention and interest due to its exclusive geographical and racial affiliation. To date, the expression of only a handful of RPs had been implicated in NPC progression and none of those reported were functionally investigated. Therefore, this study aims to characterise the interaction of a subset of ribosomal proteins and their putative co-acting factor in NPC cells. Differential expression of eight RP genes (*uS4 (S9)*, *eS8 (S8)*, *eS31 (S27a)*, *eL6 (L6)*, *uL14 (L23)*, *eL18 (L18)*, *eL24 (L24)*, *eL30 (L30)*) and three possible target proteins (*NPM1*, *BTF3* and *UBA52*) was determined in six different NPC cell lines (HONE-1, SUNE-1, HK1, TW01, TW04 and C666-1) compared to an immortalized nasopharyngeal epithelial cell line (NP69). Of the eight RP genes, four RPs (*uS4 (S9)*, *eS8 (S8)*, *eS31 (S27a)* and *uL14 (L23)*) and a potential binding partner, *NPM1*, were significantly dysregulated in their transcript and protein levels in NPC cell lines. On the other hand, this study also demonstrated the insignificant correlation in terms of the expression levels of *eL6 (L6)*, *eL18 (L18)*, *eL24 (L24)*, *eL30 (L30)*, *BTF3*, and *UBA52*, in the progression of NPC. Additionally, sequence analyses revealed missense mutations on *uS4 (S9)* and *uL14 (L23)*. Subsequent *in vitro* and *in vivo* protein-protein interaction assay demonstrated the direct association of *uS4 (S9)* and *uL14 (L23)* to *NPM1*. The central domain of *uS4 (S9)* was able

to interact with the N- and C-terminal domains of NPM1, while the centre motif of uL14 (L23) interacted with the N-terminal oligomerization domain of NPM1. Both RPs were identified as positive regulators of MDM2 by sequestering NPM1, while uL14 (L23) also played a dual-role as negative regulator of NPM1. Overall, this study has revealed the over-expression of uS4 (S9) and uL14 (L23) in NPC cells induced the translocation of NPM1 from the nucleolus to the nucleoplasm and cytoplasm, which in turn, transactivated MDM2 and its associated effector pathways in promoting tumorigenicity of NPC.

**Keywords:** Ribosomal proteins, nasopharyngeal carcinoma, protein-protein interaction, NPM1

## ***Pencirian Interaksi antara Subset Protein Ribosom dan Faktor-faktor yang Berinteraksi dalam Karsinoma Nasofaring***

### **ABSTRAK**

*Protein ribosom (RP) adalah keluarga protein yang, bersama-sama dengan rRNA, membentuk subunit ribosom yang terlibat dalam biosintesis protein dan ia secara tradisinya dipercayai hanya memainkan peranan dalam biogenesis ribosom, RP masih jarang diterokai sehingga kajian dari beberapa dekad yang lalu menunjukkan peranan tambahan-ribosom RP, terutamanya dalam tumorigenesis pelbagai jenis kanser. Berbanding dengan kanser lain yang dikaji dengan baik seperti karsinoma payudara, paru-paru dan kolorektal, penyelidikan RP dalam kes karsinoma nasofaring (NPC), khususnya, mendapat sedikit perhatian dan kepentingan global disebabkan oleh hubungan geografi dan perkaumannya yang eksklusif. Setakat ini, hanya segelintir RP yang telah dilaporkan terlibat dalam perkembangan NPC dan daripada kajian tersebut, tiada yang mengkaji aspek kefungsiannya. Oleh itu, kajian ini bertujuan untuk mencirikan interaksi subset protein ribosomal dan faktor co-actative mereka dalam sel karsinoma nasofaring (NPC). Perbezaan ekspresi untuk lapan gen RP (uS4 (S9), eS8 (S8), eS31 (S27a), eL6 (L6), uL14 (L23), eL18 (L18), eL24 (L24), eL30 (L30)) dan tiga protein target (NPM1, BTF3 and UBA52) telah ditentukan dalam enam kultur sel NPC (HONE-1, SUNE-1, HK1, TW01, TW04 and C666-1) berbanding dengan kul sel epitelium nasofaring yang normal (NP69). Daripada lapan RPs, hanya empat RPs (uS4 (S9), eS8 (S8), eS31 (S27a) and uL14 (L23)) dan satu protein sasaran ramalan, NPM1, telah menunjukkan perbezaan ekspresi yang signifikan, dalam tahap transkrip dan proteinnya. Di samping itu, kajian ini juga menunjukkan korelasi yang tidak ketara dari segi tahap espresi eL6 (L6), eL18 (L18), eL24 (L24), eL30 (L30), BTF3, dan UBA52, dalam perkembangan NPC. Selain itu, analisis turut mendedahkan mutasi 'missense' pada uS4 (S9) dan uL14 (L23). Pendekatan in vitro dan in vivo seterusnya telah*

*menentukan interaksi langsung antara uS4 (S9) dan uL14 (L23) dengan NPM1 dalam sel NPC. Domain tengah uS4 (S9) dapat berinteraksi dengan domain N- dan C-terminal NPM1, manakala motif tengah uL14 (L23) berinteraksi dengan domain oligomerisasi N-terminal NPM1. Kedua-dua RP adalah pengawal selia positif MDM2 dengan menghadkan aktiviti NPM1, manakala uL14 (L23) juga memainkan peranan dwi-ganda sebagai pengawal selia negatif NPM1. Secara keseluruhannya, kajian ini telah mendedahkan peningkatan ekspresi uS4 (S9) dan uL14 (L23) dalam sel-sel NPC yang menyebabkan penukaran lokasi NPM1 dari nukleolus ke nukleoplasma dan sitoplasma, dan juga mengaktifkan MDM2 dan laluan efektor yang berkaitan dalam perkembangan karsinogenesis NPC.*

***Kata kunci:*** *Protein ribosom, karsinoma nasofaring, protein-protein interaksi, NPM1*