

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**АНТОНЕНКО СВІТЛАНА ВАСИЛІВНА**

УДК577.2.575

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**РОЛЬ USP1, GLG1, ZNF217 У РОЗВИТКУ ТА ПРОГРЕСУВАННІ  
BCR-ABL-ПОЗИТИВНОЇ ХРОНІЧНОЇ МІЄЛОЇДНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ**

03.00.22 – молекулярна генетика

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ С.В. Антоненко

Науковий керівник: **Телегєєв Геннадій Дмитрович**, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник.

Київ – 2020

## АНОТАЦІЯ

**Антоненко С.В. Роль USP1, GLG1, ZNF217 у розвитку та прогресуванні Bcr-Abl-позитивної хронічної мієлоїдної лейкемії.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

*Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.22 «Молекулярна генетика». – Інститут молекулярної біології і генетики Національної Академії Наук України, Київ, 2020.*

За даними Всесвітньої організації здоров'я онкологічні захворювання знаходяться на другому місці серед причин людської смертності, проте уже в найближче десятиліття смертність від онкопатологій в Україні може посісти перше місце. Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) – це клональне мієлопроліферативне порушення гемопоетичної стовбурової клітини, що складає 15-20% від загальної кількості хворих на лейкемії. Цитогенетичним маркером ХМЛ є Філадельфійська (Ph+) хромосома, яка утворюється в результаті реципрокної транслокації між 9 та 22 хромосомами. Філадельфійська хромосома кодує гібридний онкоген *Bcr-Abl*, який утворюється шляхом злиття 5'- області гену *Bcr* з основною 3'- частиною гену *Abl*, продуктом гена є онкобілок Bcr-Abl з конститутивною тирозин кіназною активністю. Під час транслокації розриви в гені *Abl* можуть відбутися у межах двох екзонів, але за рахунок альтернативного сплайсингу до мРНК Bcr-Abl завжди потрапляє лише другий екзон. В той час як ген *Bcr* має три точки розриву, що призводить до появи трьох різних за довжиною форм онкобілка Bcr-Abl з молекулярною масою 190 кДа, 210 кДа та 230 кДа. Єдиною структурною відмінністю між ними є наявність доменів DH, PH у частині Bcr форми p210, p230 і їх відсутність у формі p190, проте фенотипово ці форми мають несподівано великі відмінності в інтерактомі, фосфопротеомі білків та асоційовані з різними формами захворювання. Так, форма p190 характерна для гострої лімфобластної лейкемії (ГЛЛ), p210 – для хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ), а найдовша

форма p230 зустрічається при відносно доброякісній нейтрофільній формі мієлоїдної лейкемії. Переважна більшість сучасних експериментальних досліджень зосереджена на вивченні тирозин кіназної активності онкобілка Bcr-Abl, залишаючи поза увагою частину Bcr, хоча саме домени DN і PH впливають на інтерактом онкодрайвера, гостроту перебігу та форму захворювання. Першим інгібітором тирозин кіназної активності онкобілка Bcr-Abl введеним у клінічну терапію був іматиніб, але незважаючи на ефективність та добре перенесення у порівнянні із іншими цитостатиками, майже у третини пацієнтів розвивається стійкість до препарату. Причиною цьому є точкові мутації, які виникають на кіназному домені Abl та викликають резистентність не лише до іматиніб, а й до препаратів другого (нілотиніб, дазатиніб) та третього покоління (понатиніб). Альтернативним підходом до боротьби з ХМЛ є селективне зниження рівня онкобілка, що передбачає глибоке розуміння молекулярних перебудов, сигнальних каскадів онкопроцесу та детальний скринінг білків партнерів Bcr-Abl, здатних виступати в якості терапевтичної мішені.

Тому представлена дисертаційна робота присвячена пошуку нових білків-партнерів онкобілка Bcr-Abl та встановленню їх ролі у розвитку і прогресуванні хронічної мієлоїдної лейкемії.

У дисертаційній роботі вперше встановлено взаємодію онкобілка Bcr-Abl з білком убіквітин специфічною протеазою 1 (USP1) у клітинах хворого на ХМЛ на стадії баластного кризу. За допомогою імунофлуоресцентного аналізу та конфокальної мікроскопії показано, що утворення білкового комплексу Bcr-Abl/USP1 відбувається в ядрі клітини. USP1 є деубіквітинуючим ферментом, який регулює убіквітин залежну деградацію білків та шляхом зміни типу убіквітинування впливає на локалізацію білків субстратів, участь у сигнальних шляхах, клітинних процесах тощо. Розпізнавання білка субстрату деубіквітиназами відбувається шляхом селективного зв'язування з доменами цільового білка чи за рахунок білків адаптерів. У представленій роботі з'ясовано, що специфічність зв'язування Bcr-Abl/USP1 реалізується шляхом

взаємодії деубіквітинази USP1 із PH доменом Vcr частини онкобілка. Показано, що рекомбінантний PH переважно накопичується в ядрі клітини, де й утворює комплекс з білком USP1. Встановлено, що з рекомбінантним доменом PH зв'язуються три ізоформи білка USP1, в той час як Vcr-Abl взаємодіє лише із двома ізоформами, що може бути викликано особливостями фолдингу онкобілка, його пострасляційними модифікаціями тощо.

Однією з головних властивостей онкобілка Vcr-Abl є неконтрольоване фосфорилювання своїх білків партнерів. У представленій роботі за допомогою методу ко-імунопреципітації та імуофлуоресцентного аналізу показано, що ізоформи білка USP1, які взаємодіють з онкобілком Vcr-Abl, фосфорилювані за сайтами тирозину. Згідно даних біоінформатичного аналізу найбільшу імовірність фосфорилювання на білкові USP1 мають Y504, Y678, Y681 тирозинові сайти.

У дисертаційній роботі вперше продемонстровано, що інгібування функціональних властивостей деубіквітинази USP1 корелює зі зниженням рівня онкобілка Vcr-Abl у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії людини. Помічено, що дана особливість співпадає у часі із низькою чи відсутньою колокалізацією білків Vcr-Abl/USP1 в клітинах K562. Вперше експериментально підтверджено, що інгібування утворення білкового комплексу USP1 із UAF1 (USP1 активуючий фактор 1), за допомогою ML323, змінює ядерну локалізацію USP1 на цитоплазматичну. Таким чином, вперше запропоновано гіпотетичну модель, згідно якої білок USP1 шляхом деубіквітинуючої активності запобігає протеосомній деградації онкобілка Vcr-Abl та є перспективною терапевтичною мішенню при терапії ХМЛ.

У наступному підрозділі роботи вперше продемонстровано пряму взаємодію онкобілка Vcr-Abl з гольджі глікопротеїн 1 (GLG1) у клітинах K562. За допомогою імуофлуоресцентного аналізу та конфокальної мікроскопії виявлено колокалізацію білків Vcr-Abl/GLG1 у комплексі Гольджі. За результатами біоінформатичного аналізу спрогнозовано тирозинові сайти на білкові GLG1, які можуть бути фосфорилювані за рахунок тирозин кіназної

активності онкобілка Src-Abl. Так для ізоформи 1 і 3 найвищу імовірність фосфорилування мають Y823, Y878 сайти, а для ізоформи 2 – Y812, Y867. Експериментально підтверджено, що ізоформа білка GLG1, яка взаємодіє з онкобілком Src-Abl є фосфорильованою за тирозином. З ряду наукових досліджень відомо, що дерегуляція білка GLG1 у комплексі Гольджі шляхом білкових взаємодій, призводить до порушення процесів адгезії, рухливості та міграції клітин. Припускається, що тирозин кіназа Src-Abl може неконтрольовано активувати функції білка GLG1, що призводить до порушення низхідних сигнальних шляхів та створює передумови для метастазування Ph-позитивних клітин при ХМЛ.

У представленій роботі вперше показано ядерну колокалізацію онкобілка Src-Abl і білком цинкового пальця 217 (ZFP217), який бере участь у регуляції проліферації та диференціації клітин, відповіді на супресори росту, стабільності геному, антипроліферативній сигналізації тощо. Встановлено, що інгібування тирозин кіназної активності Src-Abl за допомогою іматинібу, корелює з низькою чи повною відсутністю експресії білка ZFP217 у клітинах K562 та знижує рівень ядерної локалізацію самого онкобілка.

Здійснили модифікацію та адаптацію методу імунофлуоресцентного аналізу для роботи із суспензійною культурою K562, зокрема для визначення локалізації та колокалізації білків клітини.

Таким чином, у представленій дисертаційній роботі вперше встановлено та охарактеризовано взаємодії онкобілка Src-Abl із білками USP1, GLG1 та колокалізацію з білком ZFP217 у Ph-позитивних клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії людини. Встановлено залежність між активністю деубіквітинази USP1 і рівнем онкобілка Src-Abl. Визначено можливий вплив неконтрольованої тирозин кіназної активності Src-Abl на функціональні властивості білків партнерів (USP1, GLG1, ZFP217). Адаптовано метод імунофлуоресцентного аналізу для роботи з суспензійними клітинами K562. Отримані в дисертаційній роботі результати можуть бути використані для подальшого вивчення етіології хронічної мієлоїдної лейкемії та розробки нової стратегії лікування на основі

терапевтичних білків-мішеней, здатних селективно взаємодіяти з онкобілком Bcr-Abl та сприяти його клітинному протеолізу.

**Ключові слова:** хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ), онкобілок Bcr-Abl, домен PH, білок USP1, білок GLG1, білок ZFP217.

### Список публікацій здобувача:

1. Гур'янов Д, Лисецька Т, Кравчук І, **Антоненко С**, Телегеев Г.Д. Роль домену PH білка BCR у клітинних процесах, що визначають фенотип Ph<sup>+</sup>-позитивних мієлопроліферативних захворювань. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2014;15:44-48.
2. **Антоненко С**, Кравчук І, Гур'янов Д, Телегеев Г. Убіквітин специфічна протеаза 1 (USP1) – потенційний партнер Bcr-Abl онкобілку: біоінформатичний аналіз та отримання рекомбінантних конструкцій. Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. 2014;12(2):249-255.
3. **Antonenko S**, Gurianov D, Telegeev G. Colocalization of USP1 and PH domain of BCR-ABL oncoprotein in terms of chronic myeloid leukemia cell rearrangements. Cytology and Genetics. 2016;50(4):11-15.
4. **Антоненко С**, Кравчук І, Гур'янов Д, Телегеев Г. Білки партнери PH протеїна Bcr-Abl: створення генетичних конструкцій для виявлення молекулярних особливостей розвитку ХМЛ . Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017;20:47-52.
5. **Антоненко С**, Гур'янов Д, Кравчук І, Телегеев Г. Аналіз клітинної локалізації PH домена Bcr-Abl з білком USP1 та розробка програми для оцінки їх сайтів фосфорилування. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2018;22:90-95.
6. **Антоненко С**, Поліщук Ю, Телегеев Г. Фосфорилування сайтів Tug білка USP1 у клітинах K562 як фактор прогресії хронічної мієлоїдної лейкемії.

Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. 2019;17(2):249-255.

7. **Antonenko S**, Kravchuk I, Telegeev G. Bcr-Abl oncoprotein interacts with GLG1 in K562 cells: role in pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cytology and Genetics*. 2020;54(1):62-70.
8. **Antonenko S**, Telegeev G. Inhibition of USP1, a new partner of Bcr-Abl, results in decrease of Bcr-Abl levels in K562 cells. *Experimental oncology*. 2020;42(2):109-114.
9. **Antonenko S**, Cherepenko O, Telegeev G. Gene signatures in cancer may also overlap at the level of the product special domain organization and function: SW01. 38th FEBS congress; 2013 July 6-11, St.Petersburg, Russia.
10. **Antonenko S**, Telegeev G. USP1 as a potential partner of Bcr-Abl oncoprotein. VIII Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine dedicated to 90<sup>th</sup> Anniversary of P.G.Kostyuk; 2014 May 20-21, Kyiv, Ukraine.
11. **Antonenko S**, Gurianov D, Telegeev G. Colocalization of USP1 protein and PH domain Bcr-Abl oncoprotein as precondition of their interaction with CML. CYS conference of Young Scientists; 2015 September 21-25, Kyiv, Ukraine.
12. **Antonenko S**, Telegeev G. Colocalization of USP1 protein and PH domain of Bcr-Abl oncoprotein in HEK293 cells. XI Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine dedicated to 160<sup>th</sup> Anniversary of M. F. Kastschenko; 2015 May 26-27, Kyiv, Ukraine.
13. Дуридівка О., **Антоненко С**. Створення генетичної конструкції рCMV-НА-USP1 для еукаріотичної експресії рекомбінантного білка USP1. X Міжнародна конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери»; 2015 грудень 2-4, Харків, Україна.
14. Gurianov D, **Antonenko S**, Telegeev G. Colocalization analysis shows the role of PH domain of BCR in proteasomal degradation and clathrin-mediated

- endocytosis. Young Scientist Forum «Molecules in Living Cells and in Innovative Medicine»; 2016 July 10-12, Wrocław, Poland.
15. **Антоненко С**, Гурянов Д, Кравчук І, Телегєєв Г. Колокалізація USP1 і CTTN із PH доменом онкобілка та їх роль у розвитку ХМЛ. XIII з'їзд онкологів та радіобіологів України; 2016 травень 26-28, Київ, Україна.
  16. Gurianov D, **Antonenko S**, Kravchuk I, Telegeev G. Colocalization analysis shows that PH domain of BCR may play role in proteasomal degradation and clathrin-mediated endocytosis through proteins CTTN and USP1 but unlikely to influence cell adhesion. 41th FEBS congress; 2016 September 3-8, Kuşadası, Turkey.
  17. **Antonenko S**, Gurianov D, Kravchuk I, Telegeev G. Role of USP1, CORTACTIN and HSP27 proteins in molecular mechanisms that affect CML development. International Scientific Conference Normal and cancer stem cells: discovery, diagnosis and therapy; 2017 October 5–6, Kyiv, Ukraine.
  18. Gurianov D, **Antonenko S**, Telegeev G. Possible role of PH domain of Bcr in molecular pathways that determine the phenotype of myeloproliferative disorder in Bcr-Abl positive leukemias. LIMSC – 10th Leiden International (Bio) Medical Student Conference; 2017 March 15, Leiden, Netherlands.
  19. **Antonenko S**, Gurianov D, Telegeev G. USP1 protein colocalizes with Bcr-Abl oncoprotein in K562 cells and acts as potential target for CML therapy. XI Parnas Conference - Young scientists forum biochemistry and molecular biology for innovative medicine; 2018 September 3-5, Kyiv, Ukraine.
  20. **Antonenko S**, Telegeev G. Interaction of USP1 protein and PH domain of Bcr protein and its role in Bcr-Abl evasion from proteasomal degradation. II International Conference Tumor and Host: Novel Aspects of Old Problem; 2019 November 21–22, Kyiv, Ukraine.
  21. **Antonenko S**, Polishchuk Y, Telegeev G. ZNF217 protein expression in Bcr-Abl-positive chronic myeloid leukemia cells. XIV Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine; 2020 May 27-28, Kyiv, Ukraine.



## SUMMARY

**Antonenko S.V. Role of USP1, GLG1, ZNF217 in the development and progression of Bcr-Abl-positive chronic myeloid leukemia. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.**

*Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 03.00.22. – Molecular Genetics. – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.*

According to the World Health Organization, oncological diseases are in second place among the causes of human mortality, however in the next decade, cancer deaths in Ukraine may take the first place. Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative disorder of the hematopoietic stem cell, accounting for 15-20% of the total number of patients with leukemia. The CML cytogenetic marker is the Philadelphia (Ph +) chromosome, which is formed by the reciprocal translocation between the 9 and 22 chromosomes. The Philadelphia chromosome encodes a *Bcr-Abl* hybrid oncogene, which is formed by the fusion of the 5'-region of the *Bcr* gene with the major 3'-part of the *Abl* gene, the product of the gene is Bcr-Abl oncoprotein with constitutive tyrosine kinase activity. During translocation, breaks in the *Abl* gene can occur within two exons, but due to alternative splicing, only the second exon always gets to the Bcr-Abl mRNA. While the *Bcr* gene has three breakpoints, it results in the appearance of three different length forms of the Bcr-Abl oncoprotein with a molecular weight of 190 kDa, 210 kDa, and 230 kDa. The only structural difference between them is the presence of DH and PH domains in the Bcr part of p210, p230 forms, and their absence in p190, nevertheless phenotypically these forms have unexpectedly large differences in interactome, protein phosphoproteomes and are associated with different forms of the disease. Thus, p190 is specific to acute lymphoblastic leukemia (ALL), p210 - to chronic myeloid leukemia (CML), and the longest p230 form is found in the relatively benign neutrophilic form of myeloid leukemia. The majority of modern experimental studies is focused on the study of tyrosine kinase activity of the Bcr-Abl oncoprotein, leaving

aside the Bcr part of it, although DH and PH domains affect interactome of the oncodriver, course acuity, and disease form. Imatinib was the first to be introduced into clinical therapy as the tyrosine kinase inhibitor of Bcr-Abl oncoprotein, but despite its efficacy and satisfactory tolerability compared to other cytostatics, almost one-third of patients develop the resistance to such therapy. This is caused by the point mutations occurring on Abl kinase domain and gives rise to resistance not only to imatinib but also to the second-line drugs (nilotinib, dasatinib) and third-line (ponatinib). An alternative approach to treat CML is the selective reduction of the oncoprotein level, which provides a thorough understanding of molecular rearrangements, signaling cascades in malignant cells, and detailed screening of Bcr-Abl partner proteins as novel therapeutic targets.

Presented dissertation is dedicated to the search for the new partner proteins of the Bcr-Abl oncoprotein for establishing their role in the development and progression of chronic myeloid leukemia.

In the dissertation, for the first time, the interaction of Bcr-Abl oncoprotein with USP1 protein was established in cells of a patient with blast crisis of CML. Immunofluorescence analysis and confocal microscopy revealed that the formation of the Bcr-Abl/USP1 protein complex occurs in the cell nucleus. USP1 is a deubiquitinating enzyme that regulates ubiquitin-dependent protein degradation, and by altering the type of ubiquitination, affects the localization of substrate proteins, involvement in signaling pathways, cellular processes, etc. The recognition of the substrate protein by deubiquitinase occurs through selective binding to the target protein domains or through adapter proteins. The binding specificity of Bcr-Abl/USP1 is implemented by the interaction of the USP1 deubiquitinase with the PH domain of the Bcr part of the oncoprotein. It is shown that recombinant PH mainly accumulates in the cell nucleus, where it forms a complex with the USP1 protein. It has also been found that three isoforms of the USP1 protein bind to the recombinant PH domain, while Bcr-Abl interacts with only two isoforms of the USP1, which may be caused by the features of the oncoprotein folding, its post-translational modifications, etc.

One of the main properties of the Bcr-Abl oncoprotein is the uncontrolled phosphorylation of its partner proteins. In the present work, using the method of co-immunoprecipitation and immunofluorescence analysis, it is shown that the isoforms of the USP1 protein that interact with the Bcr-Abl oncoprotein are phosphorylated at tyrosine sites. According to bioinformatics analysis, Y504, Y678, Y681 tyrosine sites have the highest likelihood of phosphorylation on USP1 protein.

In the dissertation, it was first demonstrated that inhibition of the functional properties of USP1 deubiquitinase correlates with a decrease level of Bcr-Abl oncoprotein in cells of chronic myeloid leukemia. It is observed that this feature coincides in time with the low or no colocalization of Bcr-Abl/USP1 proteins in K562 cells. For the first time, it has been experimentally confirmed that inhibition of USP1/UAF1 protein complex formation by ML323 alters nuclear localization of USP1 to cytoplasmic. Thus, for the first time, a hypothetical model was proposed, according to which the protein USP1 by its deubiquitination activity prevents proteasomal degradation of the Bcr-Abl oncoprotein and is a promising therapeutic target in the CML treatment.

In the following section of the paper first demonstrated the direct interaction of the Bcr-Abl oncoprotein with GLG1 protein in K562 cells. Colocalization of Bcr-Abl/GLG1 proteins in the Golgi complex was detected by immunofluorescence analysis and confocal microscopy. According to the results of bioinformatics analysis, tyrosine sites are predicted for GLG1 protein, which can be phosphorylated due to the tyrosine kinase activity of the Bcr-Abl oncoprotein. Thus, for isoforms 1 and 3, the highest probability of phosphorylation is for Y823, Y878 sites, and for isoform 2 - Y812, Y867. It is experimentally confirmed that the isoform of the GLG1 protein, which interacts with the Bcr-Abl oncoprotein, is tyrosine phosphorylated. It is known that the deregulation of GLG1 protein by protein interactions in the Golgi complex leads to disturbance of adhesion, mobility and cell migration. It is suggested that Bcr-Abl tyrosine kinase may uncontrollably activate GLG1 protein functions, leading impairment of downstream signaling pathways and create prerequisites for CML progression.

It was shown that the nuclear colocalization of the Bcr-Abl oncoprotein and the ZFP217 protein is involved in the regulation of cell proliferation and differentiation, responses to growth suppressors, genome stability of antiproliferative signaling, and so on. The inhibition of tyrosine kinase activity of Bcr-Abl by imatinib has been found to correlate with the low or complete absence of ZFP217 protein expression in K562 cells and affect the nuclear localization of the oncoprotein itself.

The modification and adaptation of the immunofluorescence assay method for working with K562 suspension culture was demonstrated, in particular for determining the localization and colocalization of cell proteins.

Thus, in the presented dissertation, the interactions between the Bcr-Abl oncoprotein with USP1, GLG1 proteins, and colocalization with ZFP217 protein in Ph-positive cells of chronic human myeloid leukemia were first demonstrated and characterized. The correlation between USP1 deubiquitinase activity and Bcr-Abl protein level was established. The possible effect of the uncontrolled tyrosine kinase activity of Bcr-Abl on the functional properties of partner proteins (USP1, GLG1, ZFP217) was determined. The immunofluorescence assay method for working with K562 suspension cells has been modified and adapted. The results obtained in the dissertation can be used to further study the etiology of chronic myeloid leukemia and to develop a new treatment strategy based on therapeutic target proteins capable of selectively interacting with the Bcr-Abl oncoprotein and promoting its cellular proteolysis.

**Keywords:** chronic myeloid leukemia (CML), Bcr-Abl oncoprotein, PH domain, USP1 protein, GLG1 protein, ZFP217 protein.

**List of scientific publications published on the topic of the dissertation:**

1. Gurianov D, Lysetska T, **Antonenko S**, Kravchuk I, Telegeev G. Role of PH domain of Bcr protein in cellular processes that determine the phenotype of Ph<sup>+</sup>-positive myeloproliferative disorders. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2014;15:44-48.
2. **Antonenko S**, Kravchuk I, Gurianov D, Telegeev G. Ubiquitin specific proteases 1 (USP1) – potential partners of BCR-ABL oncoprotein: bioinformatic analysis and recombinant constructs creation. *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*. 2014;12(2):249-255.
3. **Antonenko S**, Gurianov D, Telegeev G. Colocalization of USP1 and PH domain of BCR-ABL oncoprotein in terms of chronic myeloid leukemia cell rearrangements. *Cytology and Genetics*. 2016;50(4):11-15.
4. **Antonenko S**, Kravchuk I, Gurianov D, Telegeev G. Proteins-partners of PH domain of Bcr-Abl protein: creation of DNA constructs to uncover molecular characteristics of CML development. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2017;20:47-52.
5. **Antonenko S**, Gurianov D, Kravchuk I, Telegeev G. Analysis of cellular localization of PH domain of Bcr-Abl with USP1 protein and development of software for estimation of their phosphorylation sites. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2018;22:90-95.
6. **Antonenko S**, Polishchuk Yu, Telegeev G. Phosphorylation of tyrosine sites of USP1 protein in K562 cell as a progression factor of chronic myeloid leukemia. *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*. 2019;17(2):249-255.
7. **Antonenko S**, Kravchuk I, Telegeev G. Bcr-Abl oncoprotein interacts with GLG1 in K562 cells: role in pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cytology and Genetics*. 2020;54(1):62-70.

8. **Antonenko S**, Telegeev G. Inhibition of USP1, a new partner of Bcr-Abl, results in decrease of Bcr-Abl levels in K562 cells. *Experimental oncology*. 2020;42(2):109-114.
9. **Antonenko S**, Cherepenko O, Telegeev G. Gene signatures in cancer may also overlap at the level of the product special domain organization and function: SW01. 38th FEBS congress; 2013 July 6-11, St.Petersburg, Russia.
10. **Antonenko S**, Telegeev G. USP1 as a potential partner of Bcr-Abl oncoprotein. VIII Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine dedicated to 90<sup>th</sup> Anniversary of P.G.Kostyuk; 2014 May 20-21, Kyiv, Ukraine.
11. **Antonenko S**, Gurianov D, Telegeev G. Colocalization of USP1 protein and PH domain Bcr-Abl oncoprotein as precondition of their interaction with CML. CYS conference of Young Scientists; 2015 September 21-25, Kyiv, Ukraine.
12. **Antonenko S**, Telegeev G. Colocalization of USP1 protein and PH domain of Bcr-Abl oncoprotein in HEK293 cells. XI Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine dedicated to 160<sup>th</sup> Anniversary of M. F. Kastschenko; 2015 May 26-27, Kyiv, Ukraine.
13. Duridivka O, **Antonenko S**. Creation of genetic construct pCMV-HA-USP1 for eukaryotic expression of recombinant protein USP1. X International Scientific Conference Young Scientist «Biology: from the molecule to the biosphere»; 2015 December 2-4, Kharkiv, Ukraine.
14. Gurianov D, **Antonenko S**, Telegeev G. Colocalization analysis shows the role of PH domain of BCR in proteasomal degradation and clathrin-mediated endocytosis. Young Scientist Forum «Molecules in Living Cells and in Innovative Medicine»; 2016 July 10-12, Wrocław, Poland.
15. **Antonenko S**, Kravchuk I, Gurianov D, Telegeev G. Colocalization USP1, CTTN and PH domain oncoprotein and their role in the development of CML. XIII Congress of Oncologist and Radiologists of Ukraine; 2016 May 26-28, Kyiv, Ukraine.

16. Gurianov D, **Antonenko S**, Kravchuk I, Telegeev G. Colocalization analysis shows that PH domain of BCR may play role in proteasomal degradation and clathrin-mediated endocytosis through proteins CTTN and USP1 but unlikely to influence cell adhesion. 41th FEBS congress; 2016 September 3-8, Kuşadası, Turkey.
17. **Antonenko S**, Gurianov D, Kravchuk I, Telegeev G. Role of USP1, CORTACTIN and HSP27 proteins in molecular mechanisms that affect CML development. International Scientific Conference Normal and cancer stem cells: discovery, diagnosis and therapy; 2017 October 5–6, Kyiv, Ukraine.
18. Gurianov D, **Antonenko S**, Telegeev G. Possible role of PH domain of Bcr in molecular pathways that determine the phenotype of myeloproliferative disorder in Bcr-Abl positive leukemias. LIMSC – 10th Leiden International (Bio) Medical Student Conference; 2017 March 15, Leiden, Netherlands.
19. **Antonenko S**, Gurianov D, Telegeev G. USP1 protein colocalizes with Bcr-Abl oncoprotein in K562 cells and acts as potential target for CML therapy. XI Parnas Conference - Young scientists forum biochemistry and molecular biology for innovative medicine; 2018 September 3-5, Kyiv, Ukraine.
20. **Antonenko S**, Telegeev G. Interaction of USP1 protein and PH domain of Bcr protein and its role in Bcr-Abl evasion from proteasomal degradation. II International Conference Tumor and Host: Novel Aspects of Old Problem; 2019 November 21–22, Kyiv, Ukraine.
21. **Antonenko S**, Polishchuk Y, Telegeev G. ZNF217 protein expression in Bcr-Abl-positive chronic myeloid leukemia cells. XIV Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine; 2020 May 27-28, Kyiv, Ukraine.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	19
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	28
1.1. Bcr-Abl як онкодрайвер Ph-позитивної хронічної мієлоїдної лейкемії людини	28
1.1.1. Молекулярно-генетичні механізми розвитку ХМЛ	28
1.1.2. Онкобілок Bcr-Abl та його роль у лейкемогенезі	30
1.1.3. Сучасні проблеми та перспективи терапії ХМЛ	34
1.2. Убіквітин специфічна протеаза 1	37
1.3. Гольджі глікопротеїн 1	44
1.4. Білок цинкового пальця 217	47
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	54
2.1. Матеріали та обладнання	54
2.2. Використані у роботі ферменти	56
2.3. Використані в роботі антитіла	56
2.4. Біологічний матеріал	56
2.5. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)	57
2.6. Електрофорез нуклеїнових кислот у агарозному гелі	57
2.7. Виділення фрагментів ДНК з агарозного гелю	58
2.8. Фосфорилування фрагментів ДНК	58
2.9. Реакція рестрикції	58
2.10. Дефосфорилування	59
2.11. Плазмідні конструкції	59
2.12. Реакція лігування	60
2.13. Отримання компетентних клітин	60
2.14. Трансформація	60
2.15. Виділення плазмід	61
2.16. Очищення плазмідних векторів від молекул РНК	61



2.17. Експресія рекомбінантних білків в <i>E. Coli</i>	62
2.18. Очищення рекомбінантних білків за допомогою афінної хроматографії	62
2.19. Культивування клітин ссавців	63
2.20. Трансфекція клітин еукаріотичної лінії 293Т	64
2.21. Приготування лізатів клітин ссавців	64
2.22. Коімунопреципітація білкових комплексів	65
2.23. Культивування клітин K562 з ML323	66
2.24. Електрофоретичне розділення білків у поліакриламідному гелі	66
2.25. Вестерн-блот аналіз	67
2.26. Біоінформатичне передбачення сайтів фосфорилування	68
2.27. Культивування клітин K562 з іматинібом	68
2.28. Імунофлуоресцентний аналіз	68
2.29. Кількісний аналіз колокалізації білків	69
2.30. Статистична обробка результатів	69
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	70
3.1. Ідентифікація та характеристика білкового комплексу Bcr-Abl/USP1 у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії людини	70
3.1.1. Взаємодії онкобілка Bcr-Abl і білка USP1	70
3.1.2. Колокалізації онкобілка Bcr-Abl і білка USP1 у клітинах K562	73
3.3.2.1. Адаптація імунофлуоресцентного методу для роботи із суспензійною культурою K562	73
3.3.2.2. Колокалізація білків Bcr-Abl і USP1	74
3.1.3. Визначення фосфорильованих форм білка USP1	80
3.1.3.1. Біоінформатичне передбачення сайтів фосфорилування на білку USP1	80
3.1.3.2. Імунопреципітація фосфорильованих форм USP1 з лізатів K562	81
3.1.3.3. Імунофлюорисцентний аналіз фосфорильованих форм	

USP1	81
3.2. Взаємодія домена PH онкобілка Vcr-Abl з білком USP1	86
3.2.1. Біоінформатичний аналіз білка USP1	86
3.2.2. Створення генетичних конструкцій pCMV-NA-USP1 і pECFP-C3-USP1	87
3.2.3. Вивчення взаємодії PH домену і білка USP1 за допомогою методу коімунопреципітації	90
3.2.4. Визначення взаємодії PH домену і білка USP1 за допомогою пул-даун аналізу	92
3.2.5. Визначення субклітинної локалізації білкового комплексу PH/USP1	92
3.3. Вивчення впливу деубіквітинази USP1 на онкобілок Vcr-Abl	98
3.3.1. Дослідження колокалізації білків Vcr-Abl/USP1 під впливом інгібітора ML323	98
3.3.2. Вивчення залежності між активністю білка USP1 та рівнем онкобілка Vcr-Abl	102
3.4. Білковий комплекс Vcr-Abl/GLG1 у клітинах K562	105
3.4.1. Взаємодія онкобілка Vcr-Abl з білком GLG1	105
3.4.2. Колокалізація білків Vcr-Abl/GLG1 у комплексі Гольджі	105
3.4.3. Визначення фосфорильованих форм білка GLG1	109
3.5. Білок ZNF217 як потенційний партнер онкобілка Vcr-Abl	114
3.5.1. Колокалізація онкобілка Vcr-Abl і білка ZNF217	114
3.5.2. Вплив кіназної активності онкобілка Vcr-Abl на експресію ZNF217 у клітинах K562	115
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	119
ВИСНОВКИ	133
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	135
ДОДАТОК А	155

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

а.к.	амінокислотні залишки
ГЛЛ	гостра лімфобластна лейкемія
кДа	кілодальтон
ДМСО	диметилсульфоксид
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
ТЕМЕД	N,N,N',N'-тетраметилетилендіамін
ХМЛ	хронічна мієлоїдна лейкемія
DAPI	2-(4-amidinophenyl)-6-indolecarbomidine dihydrochloride
DUB	деубіквітинуючі білки
GLG1	гольджі глікопротеїн 1 (Golgi glycoprotein 1)
ErbB3	рецептор тирозинових протеїнкіназ (receptor tyrosine-protein kinase erbB-3)
ERK	позаклітинна сигнал-регулююча кіназа (extracellular signal-regulated kinase)
FBS	ембріональна сироватка теляти
ECL	посилена хемілюмінесценція
GAP	ГТФазо-активуючий білок (GTPase-activating protein)
IP	імунопреципітація
JAK	Янус кіназа (Janus kinases)
МАРК	мітоген-активована протеїнкіназа (mitogen-activated protein kinase)

M- <i>bcr</i>	макроділянка розривів гену <i>bcr</i>
m- <i>bcr</i>	мініділянка розривів гену <i>bcr</i>
μ- <i>bcr</i>	мікроділянка розривів гену <i>bcr</i>
MCC	кофіцієнт кореляції Мандерса
NLS	сигнал ядерної локалізації (nuclear localization signal)
PCC	кофіцієнт кореляції Пірсона
PBS	Phosphate buffered saline
PH	плекстрин-гомологічний домен (pleckstrin homology domain BCR-ABL)
Ph'-хромосома	філадельфійська хромосома
PI3K	фосфоінозитид-3-кіназа (phosphoinositide 3-kinase)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium *середовище
STAT	signal transducer and activator of transcription
USP1	Убіквітин специфічна протеаза 1 (ubiquitin specific protease 1)
WB	Вестерн-блот аналіз
ZNF217	білок цинкового пальця 217 (Zinc-finger protein 217)

## ВСТУП

**Актуальність теми.** За даними МОЗ України, близько мільйона українців мають онкологічні захворювання, щодня про смертельну недугу дізнається близько 450 людей. У розвинутих країнах онкологічні захворювання знаходяться на другому місці серед причин людської смертності, поступаючись лише хворобам серцево-судинної системи. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я уже у найближче десятиліття в Україні смертність від онкологічних патологій може посісти перше місце. Лейкемії займають перше місце серед захворювань кровотворної і лімфоїдної тканин людини. Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) – це клональне мієлопроліферативне захворювання, яке характеризується трансформацією та проліферацією гемопоетичних стовбурових клітин. ХМЛ частіше зустрічається у дорослих ніж у дітей і складає близько 15-20% від загальної кількості хворих на лейкемії. В Україні у 2019 році середні показники захворюваності на ХМЛ становили близько 7 випадків на 100 000 населення. Причиною розвитку ХМЛ є реципрокна транслокація між 9 та 22 хромосомами, що призводить до утворення гібридного онкобілка Bcr-Abl. За рахунок підвищеної конститутивної тирозинкіназної активності, онкобілок Bcr-Abl здатний порушувати проліферацію, диференціювання, адгезію клітин, робить їх нечутливими до впливу сигналів мікрооточення та антиапоптичних сигналів. Відомо декілька форм Bcr-Abl онкобілка, які попри однакову тирозинкіназну активність пов'язані з різними типами захворювання. Найбільш поширеними є форми p190 і p210, які асоційовані з гострою лімфобластною лейкемією та хронічною мієлоїдною лейкемією, відповідно. Єдиною структурною відмінністю між ними є наявність доменів DN, PH у частині Bcr форми p210 та їх відсутність у формі p190, проте фенотипово форми онкобілка Bcr-Abl мають несподівано великі відмінності в інтерактомі та тирозиновому фосфопротеомі білків. Мутації домену PH є критичними для локалізації онкобілка Bcr-Abl та формування сигнальних

мереж, а повна його відсутність у формі p210 викликає розвиток фенотипу схожого на той, що контролюється формою p190. Таким чином, саме частина Bcr визначає просторово-часову реалізацію тирозинкіназної активності онкобілка Bcr-Abl, що є основною етіологічною подією при розвитку ХМЛ.

На сьогодні основним прогностичним фактором виживання хворих на ХМЛ є відповідь на терапію інгібіторами тирозинкінази. Проте існуючі препарати (імаїніб, нілотиніб, дазатиніб, босутиніб, понатиніб) не інгібують тирозинкіназну активність Bcr-Abl в разі виникнення мутацій кіназного домену Abl, тому при тривалому лікуванні майже у третини пацієнтів розвивається стійкість до препарату. Альтернативною стратегією боротьби з ХМЛ є селективне зниження рівня онкобілка Bcr-Abl, реалізація якої передбачає детальний скринінг його білків партнерів, з метою пошуку терапевтичної мішені. Таким чином, з'ясування молекулярних механізмів функціонування онкобілка Bcr-Abl, виявлення його білкових партнерів, які залучені до злоякісної трансформації клітини та пошук білків-мішеней, що селективно впливають на онкодрайвери є запорукою розробки нових терапевтичних препаратів для лікування ХМЛ. За попередньо проведеними результатами мас-спектрометричного аналізу у відділі молекулярної генетики ІМБГ НАН України, було визначено потенційні білки-партнери, що можуть взаємодіяти із доменом PH онкобілка Bcr-Abl, серед яких були і білки USP1, GLG1, ZFP217.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась в рамках бюджетних тем: «Роль Bcr-асоційованих білків у сигнальних шляхах при мієлопроліферативних захворюваннях» (номер державної реєстрації – 0108U008527, 2009-2013 рр.), «Роль різних форм білка Bcr-Abl в сигнальних шляхах та формування пухлинного фенотипу при мієлопроліферативних неоплазмах» (номер державної реєстрації – номер державної реєстрації – 0113U004305, 2014-2018 рр.), «Ендогенні чинники

розвитку мієлопроліферативних пухлин та раку передміхурової залози» (номер державної реєстрації – 0119U100821, 2019-2023 рр.).

**Мета і завдання досліджень.** Метою дисертаційної роботи було дослідження взаємодій онкобілка *Vcr-Abl* із білками *USP1*, *GLG1*, *ZFP217* та встановлення їх ролі у розвитку та прогресуванні ХМЛ.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Клонувати кодуючу послідовність гену *USP1* у еукаріотичні вектори та отримати експресію рекомбінантних білків.
2. Адаптувати імунофлуоресцентний аналіз для роботи із суспензійними клітинами K562.
3. Дослідити можливість взаємодії *Vcr-Abl* з білком *USP1*, визначити субклітинну локалізацію даного білкового комплексу та перевірити фосфорилування білка *USP1* за сайтами тирозину у клітинах K562.
4. Проаналізувати можливість специфічного зв'язування онкобілка *Vcr-Abl* із білком *USP1* за допомогою домену PH.
5. Дослідити вплив активності деубіквітази *USP1* на рівень онкобілка *Vcr-Abl* у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії людини.
6. Визначити можливість утворення білкового комплексу *Vcr-Abl/GLG1* та його локалізацію у клітинах K562, проаналізувати фосфорилування білка *GLG1* за сайтами тирозину.
7. Дослідити колокалізацію онкобілка *Vcr-Abl* і білка *ZFP217*, а також вплив тирозинкіназної активності онкобілка *Vcr-Abl* на експресію *ZFP217* у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії людини.

**Об'єкт дослідження** – білки партнери онкобілка *Vcr-Abl* - *USP1*, *GLG1*, *ZFP217*.

**Предмет дослідження** – молекулярні механізми функціонування онкобілка *Vcr-Abl* та білків *USP1*, *GLG1*, *ZFP217* у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії людини.

**Методи дослідження** – полімеразна ланцюгова реакція, клонування фрагментів кДНК, трансформація та експресія рекомбінантного білка у клітинах *E. coli*, афінна хроматографія, пул-даун аналіз, культивування еукаріотичних культур, коімунопреципітація, електрофорез у поліакриламідному гелі, вестерн-блот аналіз, трансфекція клітин еукаріотів, біоінформатичний аналіз, імунофлуоресцентний аналіз, флуоресцентна і конфокальна мікроскопія, кількісний аналіз зображень тощо.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше встановлено взаємодію онкобілка *Vcr-Abl* з білком *USP1* та детектовано їх ядерну колокалізацію у клітинах ХМЛ людини. Визначено роль домену PH онкобілка *Vcr-Abl* у формуванні білкового комплексу *Vcr-Abl/USP1*. Підтверджено фосфорилування за тирозином для ізоформ білка *USP1*, які взаємодіють з онкобілком *Vcr-Abl*. Вперше експериментально підтверджено, що інгібування білкового комплексу *USP1/UAF1* змінює ядерну локалізацію білка *USP1* на цитоплазматичну. Виявлено, залежність між активністю білка *USP1* та рівнем онкобілка *Vcr-Abl* і запропоновано гіпотетичну модель, згідно якої білок *USP1* може бути перспективною терапевтичною мішенню при терапії ХМЛ. Вперше визначено взаємодію онкобілка *Vcr-Abl* з білком *GLG1* та показано, що білковий комплекс *Vcr-Abl/GLG1* утворюється у комплексі Гольджі. Показано, що ізоформа білка *GLG1*, яка взаємодіє з онкобілком *Vcr-Abl*, є фосфорильованою за тирозином. Було запропоновано гіпотетичну модель, згідно якої онкобілок *Vcr-Abl* за рахунок своєї тирозинкіназної активності може дерегулювати активність білка *GLG1* і таким чином впливати на адгезію, рухливість, міграцію клітин. Вперше виявлено колокалізацію білків *Vcr-Abl* і *ZFP217* та встановлено вплив тирозинкіназної активності онкобілка *Vcr-Abl* на експресію білка *ZFP217* у клітинах ХМЛ.

**Практичне значення одержаних результатів.** Представлені результати поглиблюють розуміння ролі онкобілка *Vcr-Abl* та білків *USP1*, *GLG1*, *ZFP217* у розвитку та прогресуванні ХМЛ. Створені генетичні конструкції *pUC18-*



USP1, pCMV-NA-USP1, pEGFP-C3-USP1 можуть бути використані для подальшого вивчення функціональних властивостей білка USP1 та його участі у сигнальних шляхах клітини. Адаптовано імуофлуоресцентний метод для вивчення локалізації і колокалізації білків у суспензійних клітинах K562. Ідентифікована залежність між активністю білка USP1 і рівнем онкобілка Vcr-Abl створює передумови для розвитку нової стратегії лікування Ph-позитивної ХМЛ спрямованої на USP1, що може бути перспективною терапевтичною мішенню з високою селективністю до онкобілка Vcr-Abl. Виявлений білковий комплекс Vcr-Abl/GLG1 важливий для з'ясування ролі онкобілка Vcr-Abl у комплексі Гольджі та дає підстави для дослідження ролі білка GLG1 у метастазуванні. Визначена залежність між активністю онкобілка Vcr-Abl і експресією білка ZFP217 важлива для розуміння наслідків трансформуючої активності тирозинкінази та може бути корисною при розробці стратегії, яка б перешкоджала порушенням проліферації, диференціювання клітин, та розвитку нечутливості до супресорів росту при ХМЛ.

**Особистий внесок здобувача.** Автор самостійно здійснила підбір та аналіз наукової літератури за темою дисертаційної роботи. Всі дослідження, їх обробка та аналіз результатів виконано особисто здобувачем. Клонування кодуєчої послідовності гену USP1 у плазмідні вектори, експресія рекомбінантних білків, їх очищення, дослідження білок-білкових взаємодій шляхом методу коімунопреципітації та пул-даун аналізу, виявлення фосфорильованих форм білків було проведено особисто здобувачем. Автор самостійно проводила роботу з культурами клітинних ліній еукаріот K562 та 293T, вивчала локалізацію та колокалізацію білків, визначила вплив інгібування білка USP1 на рівень онкобілка Vcr-Abl та детектувала вплив активності тирозинкінази на експресією білка ZFP217.

Конфокальну мікроскопію цитологічних препаратів проводили спільно з н.с. В.Р. Косач, м.н.с. Д.С. Гур'яновим та с.н.с. С.О. Карахімом на базі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна. Автор висловлює подяку м.н.с. І.В.

Кравчуку та м.н.с. Д.С. Гур'янову за корисні поради під час планування експериментів та обговоренні отриманих результатів. Автор щиро вдячний науковому керівникові, д.б.н., с.н.с. Телегєєву Геннадію Дмитровичу за допомогу в розробці стратегії досліджень, аналізі, узагальненні та представленні результатів експериментів у наукових публікаціях.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації були апробовані на засіданнях відділу молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ. Результати досліджень були обговорені на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях: 38th FEBS congress (Russia, St.Petersburg, 2013), VIII Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine dedicated to 90<sup>th</sup> Anniversary of P.G.Kostyuk (Ukraine, Kyiv, 2014), CYS conference of Young Scientists (Ukraine, Kyiv, 2015), X Міжнародна конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Україна, Харків, 2015), XI Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine dedicated to 160<sup>th</sup> Anniversary of M. F. Kastschenko (Ukraine, Kyiv, 2015), Young Scientist Forum «Molecules in Living Cells and in Innovative Medicine» (Poland, Wrocław, 2016), XIII з'їзд онкологів та радіобіологів (Україна, Київ, 2016), 41th FEBS congress (Turkey, Kuşadası, 2016), International Scientific Conference Normal and cancer stem cells: discovery, diagnosis and therapy (Ukraine, Kyiv, 2017), LIMSC – 10th Leiden International (Bio) Medical Student Conference (Netherlands, Leiden 2017), XI Parnas Conference - Young scientists forum biochemistry and molecular biology for innovative medicine (Ukraine, Kyiv, 2018), II International Conference Tumor and Host: Novel Aspects of Old Problem (Ukraine, Kyiv, 2019), XIV Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine (Ukraine, Kyiv, 2020).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 21 наукову працю, з них 8 статей у фахових журналах та 13 тез доповідей у збірках матеріалів вітчизняних і міжнародних наукових конференцій та з'їздів.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 203 найменувань. Дисертацію викладено на 157 сторінках стандартного машинопису, вона містить 38 рисунків, 2 таблиці та 1 додаток.

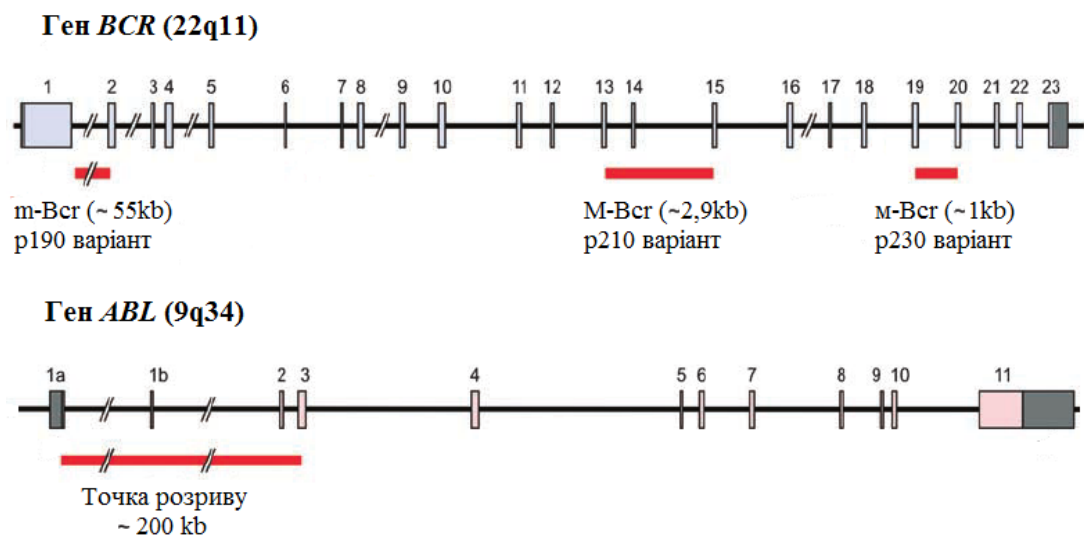
## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Bcr-Abl як онкодрайвер Ph-позитивної хронічної мієлоїдної лейкемії людини

**1.1.1. Молекулярно-генетичні механізми розвитку ХМЛ.** У 1960 р. за допомогою світлового мікроскопа Peter Nowell та David Hungerford виявили акроцентричну хромосому, яка характерна для клітин кісткового мозку пацієнтів із хронічною мієлоїдною лейкемією [5]. Згодом хромосома отримала назву «філадельфійської» (Ph) відповідно до міста, де була вперше детектована. У 1973 р. Janet Rowley встановила, що філадельфійська (Ph) хромосома утворюється в результаті реципрокної транслокації між 9 і 22 хромосомами t(9; 22) (q34; q11) [3]. Як з'ясувалося з розвитком молекулярно генетичних методів, транслокація спричиняє злиття *c-Abl* гена 9-тої хромосоми і *Bcr* гена 22-гої хромосоми, що призводить до утворення гібридного онкобілка Bcr-Abl. Першим, у 1983 році, було картовано ген *c-Abl*, який в нормі складається з 230 т. п. н., має 11 екзонів і є гомологом гена *v-Abl* вірусу лейкемії Абельсона у мишей [18]. Під час транслокації ген *c-Abl* може порушуватися в межах альтернативних екзотів 1b і 1a чи в ділянках після них. Але незалежно від місця розриву, за рахунок альтернативного сплайсингу, до мРНК Bcr-Abl завжди потрапляє лише екзон a2 [1,7,9,19]. Ген *Bcr* картували у 1984 році, в нормі він локалізується на 22 хромосомі, має розмір 130 т.п.н. та містить 23 екзони (e1-e23) [1,19,20]. Для гена *Bcr* характерні три точки розриву: макро- (M-*Bcr*), мінор- (m-*Bcr*) та мікро- (μ-*Bcr*), таким чином утворюється три форми онкобілка Bcr-Abl асоційовані з різними типами захворювання (рис.1.1.). Ділянка M-*Bcr* знаходиться в межах 12-16 екзонів (e12-e16), найчастіше розриви відбуваються в інтроні після 13 (b2) чи 14 (b3) екзону, що призводить до утворення Bcr-Abl з молекулярною масою близько 210 кДа, він експресується у клітинах хворих на ХМЛ [3,8,10-

12,19]. Розрив у ділянці *m-Bcr* відбувається між альтернативними екзонами  $e_2$  та  $e_2'$  [3,7,21-24]. Шляхом альтернативного сплайсингу екзони  $e_1'$  та  $e_2'$  видаляються, а до гібридної форми онкобілка *Bcr-Abl* потрапляє лише екзон  $e_1$ , який зливається з другим екзоном гена *abl*. Утворена таким чином, форма онкобілка *Bcr-Abl* має молекулярну масу близько 190 кДа та зустрічається у клітинах пацієнтів з ГГЛ [3,8,23-24]. Ділянка  $\mu$ -*Bcr* знаходиться між екзонами  $e_{19}$  та  $e_{20}$  та призводить до злиття екзону  $e_{19}$  гена *Bcr* з екзоном  $a_2$  гена *abl*, утворений таким чином мРНК відповідає за утворення онкобілка з молекулярною масою близько 230 кДа, який переважно зустрічається при відносно доброякісній хронічній нейтрофільній лейкемії [2,7,21].



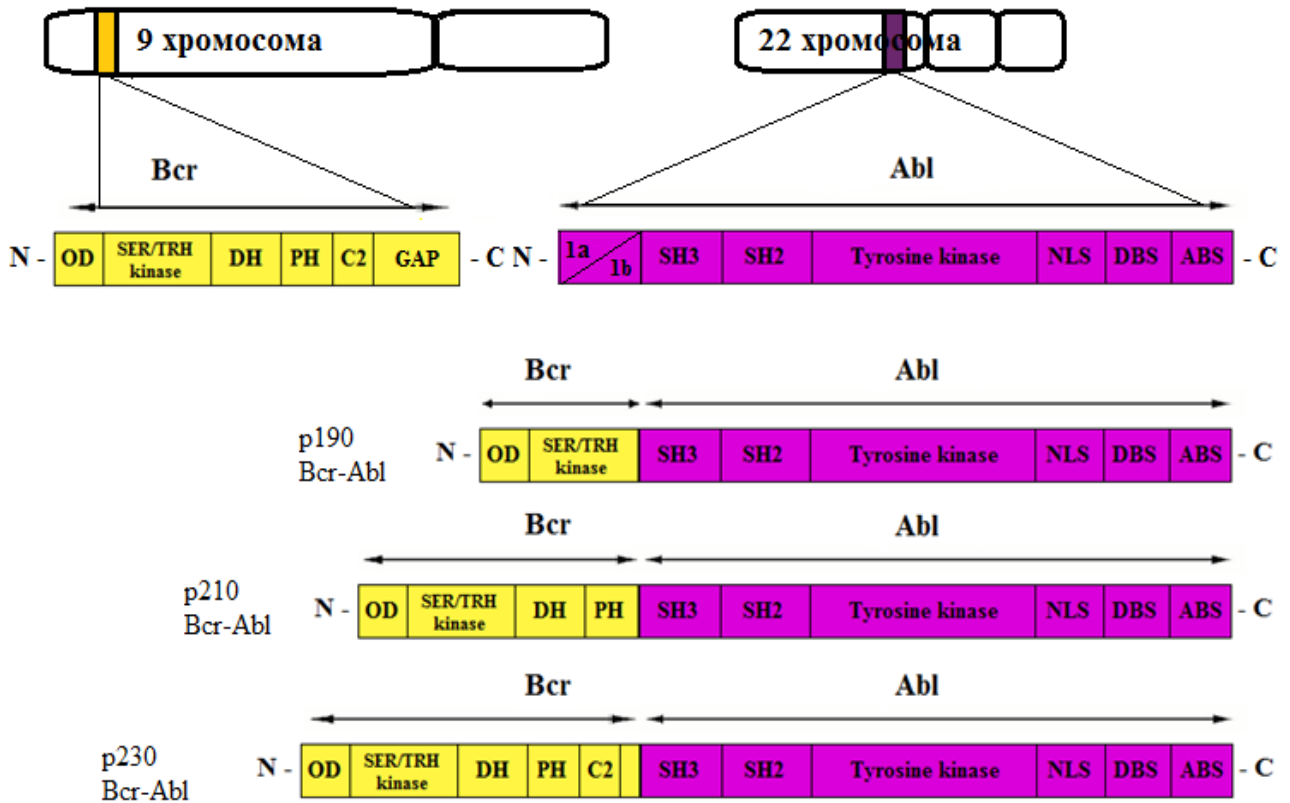
**Рис. 1.1.** Топологія генів *Bcr* і *Abl*. Позначено канонічні ділянки розривів, які утворюються під час реципрокної транслокації між 9 і 22 хромосою, що призводять до утворення різних форм онкобілка *Bcr-Abl*. Адаптовано до [21]

У деяких пацієнтів зустрічаються неканонічні точки розривів хромосом, які можуть локалізуватися як у інтронах ( $e_{ba2}$ ,  $e_{2a2}$ ) та екзонах ( $e_{2a1}$ ,  $e_{8a2}$ ,  $e_{13a2}$ ,  $e_{15a2}$ ) генів *Abl* і *Bcr*, інколи канонічні розриви поєднуються з неканонічними ( $e_{1a3}$ ,  $e_{13a3}$ ,  $e_{14a3}$ ) або до них додаються інвертовані ділянки, вставки, повтори тощо. Фенотипово накопичення додаткових мутацій супроводжується більш агресивним перебігом захворювання [25,26]

**1.1.2. Онкобілок Vcr-Abl та його роль у лейкемогенезі.** У 1990 р. було показано, що утворений у результаті злиття двох генів, онкобілок Vcr-Abl набуває конститутивної тирозин кіназної активності, що корелює із злоякісною трансформацією клітин [27]. Кіназна активність онкобілка Vcr-Abl підтримується за рахунок Abl частини, яка після транслокації, дерегулюється та набуває високу каталітичну активність і неконтрольовано фосфорилує свої білкові субстрати. За нативних умов активність кінази Abl бере участь у важливих клітинних процесів, зокрема таких як регуляція росту, виживання та міграція клітин, реакції на окислювальний стрес та пошкодження ДНК, передачі клітинних сигналів від інтегринів, тому вона має широкий спектр білкових взаємодій, серед яких регулятори клітинного циклу, фактори транскрипції, інші кінази, фосфатази, білки цитоскелету тощо [3,28,29,31]. В результаті транслокації до складу онкобілка Vcr-Abl потрапляють три домени SH3, SH2, SH1 білка Abl, де SH1 є доменом кінази, а домени SH2 і SH3 опосередковують білок-білкові взаємодії та довгий С-кінець, який складається приблизно з 600 амінокислот, має пролін-багату ділянку, яка беруть участь у білкових взаємодіях [2,29,30]. Крім того на частині Abl присутні і сигнали ядерної локалізації (NLS), ділянки, які відповідають за зв'язування з ДНК (DBS) і актином (ABS). Таким чином, до онкобілка Vcr-Abl належать майже всі функціональні домени білка Abl, за винятком ділянки, яка кодується першим екзоном (рис.1.2.). Саме втрата N-кінцевої ділянки (N-сар) білка Abl та злиття з послідовністю білка Vcr, скасовують фізіологічний контроль тирозин кінази [31].

Білок Vcr (breakpoint cluster region) вперше ідентифікований у гібридному онкобілку Vcr-Abl [32]. Найвища експресія гена *Vcr* характерна для клітин мозку та кровотворної системи [33]. Білок Vcr складається з 1271 амінокислотних залишків і має мультидоменну структуру. Vcr-частина вносить критичні домени до онкобілка Vcr-Abl, які впливають на активацією низхідних сигнальних шляхів. Перші 1-63 а.к. білка Vcr утворюють N-кінцевий домен (домен олігомеризація), вважається, що мутаційна мінливість у даній ділянці

знижує злякiсну трансформацiйну онкобiлка Bcr-Abl. Наступним доменом є серин-треонiнова кiназа, яка припадає на 176-427 а.к. [10,28,34].



**Рис. 1.2.** Будова бiлкiв Bcr, Abl та рiзних форм онкобiлка Bcr-Abl (p190, p210, p230): OD – домен олігомеризацiї, SER/TRH kinase – домен серин-треонiнiнiвної кiнази, DH – Dbl-гомолoгiчний домен, PH – плекстрин гомолoгiчний домен, C2 – домен, GAP – домен, SH3 – домен, SH2 – домен, Tyrosine kinase – домен тирозин кiнази (SH1), NLS – сигнали ядерної локалізацiї, DBS – дiлянки, взаємодiї з ДНК, ABS – дiлянки, якi зв’язують актин

Особливу цiкавiсть викликають Dbl гомолoгiчний (498-691 а.к.) та плекстрiн гомолoгiчний (PH) домени (708-866 а.к.), оскiльки вони становлять головну вiдмiннiсть мiж формами p190 i p210 онкобiлка Bcr-Abl [9,10,17]. Вiдомо, що домен DH знаходиться бiльше нiж у 70 рiзних бiлках людини [36]. Домени цiєї родини дiють як фактори обмiну гуанiновими нуклеотидами та регулятори функцiї Rho GTPаз [9,36,37]. Домени PH – це добре

охарактеризовані ліпід-зв'язуючі білкові структури, знайдені у більше ніж 250 різних білків людини, де вони зазвичай сприяють взаємодії із фосфатидилінозитолами мембран [9,35,38-40]. Після видалення домену PH із p210 онкобілка *Vcr-Abl* у мишей проявляється ознаки схожі до фенотипу з p190 [9]. Як частина DN-PH-тандему, домен PH залучений до численних функцій, зокрема локалізації мембран, алостеричної модуляції активності GEF тощо [9,40,41]. Крім того, велика кількість білків, які здатні до злоякісної трансформації мають тандем із DN-PH доменів [9,38,41]. Наступним є домен C2, який знаходиться у межах 870-1002 амінокислотних залишків і є характерним для p230 онкобілка *Vcr-Abl*. Зазвичай домени C2 присутні у білках, які пов'язані з мембранами, основною їх властивістю є здатність зв'язувати велику кількість субстратів, зокрема кальцій, фосфоліпиди, білки [42-44]. За нативних умов, 1054-1248 а.к. білка *Vcr*, займає GAP домен, основна функція якого полягає в інактивації ГТФаз клітини [3,45].

Постійна експресія онкогена *Vcr-Abl*, яка знаходиться під контролем промотору *Vcr*-частини [46] і висока неконтрольована активність тирозин кінази є першочерговими подіями у підтримці та розвитку ХМЛ [2]. Фосфорильований Tyr177 частини *Vcr* служить докінг сайтом для білка GRB2 та SOS (гуанін-нуклеотидний енансер RAS), що призводить до активації RAS-МАРК шляху і транскрипції гена *BCL-2* [5,28]. Фосфорильований білок Ras активує кіназу Raf, що є пусковим механізмом сигнального каскаду серин-треонінових МАРК кіназ (Mek1/Mek2 та Erk1/Erk2), які мігрують до ядра клітини, де шляхом фосфорилування активують фактори транскрипції c-Jun, c-Myc, c-Fos викликають експресія генів, відповідальних за проліферацію клітини [1]. Через сигнальний шлях PI3K/АКТ/FOXO4 кіназа *Vcr-Abl*, сприяє виживанню клітин та блокує важливі клітинні процеси, зокрема такі як апоптоз і аутофагія [48,49]. Механізм, відповідальний за гальмування автофагії, корелює з особливостями регуляції кінази mTOR. Онкобілок *Vcr-Abl* через шлях PI3K/Akt стимулює білок mTORC1, який утворює комплекс із кіназою mTOR та є основним негативним регулятором автофагії. Крім того, кіназа *Vcr-*



Abl, за рахунок серії фосфорилувань та за участі білкового комплексу TSC1/TSC2, здатна впливати на mTOR не лише на білковому рівні, а й на рівні транскрипції [1]. Фосфорильований кіназою Vcr-Abl, білок GRB2, сприяє активації АКТ, що лежить в основі посиленої транскрипції гена MYC та його білкової стабільності. Продемонстровано, що у Vcr-Abl-позитивних клітинах, c-MYC шляхом зв'язування з промоторними областями LIG3, ADP-рибози, PARP1 сприяє транскрипційної активності та NHEJ (генетичної рекомбінації шляхом з'єднання не гомологічних кінців) це призводить до втрати нуклеотидів, накопичення транслокацій, злиття теломер, що характерною ознакою клітин з онкопатологіями [5,50]. Vcr-Abl здатний фосфорилувати білки родини STAT, які за нативних умов активуються кіназами JAK. Фосфорилуючи білок STAT5, Vcr-Abl стимулює транскрипцію білка BCL-xL, який відповідає за інгібування апоптозу клітини [3,51-53] та позитивно впливає на регуляцію білка SIRT1, що сприяє виживанню клітин ссавців, відновленню ДНК та клітинного циклу. Нормальні гемопоетичні стовбурові клітини характеризуються низьким рівнем SIRT1, в той час як у Vcr-Abl-позитивних клітинах його рівень значно зростає, особливо на пізніх стадіях ХМЛ [5]. Плейотропна дія Vcr-Abl на сигнальні шляхи PI3K/АКТ, MAPK, STAT тощо [1,54], призводить до зміни регуляції ROS у гемопоетичних стовбурових клітинах. В результаті чого відбувається неспецифічне оксидативне пошкодження молекул ДНК та білків репарації, що супроводжується різким підвищенням генетичної нестабільності у клітині та накопиченням мутацій. Показано стабілізуючу роль онкобілка Vcr-Abl на  $\beta$ -катенін, який бере участь у сигнальних шляхах, які активуються при переході від хронічної до бластичної фази ХМЛ [5,55]. Функціонування Vcr-Abl-позитивних клітин є незалежним від факторів росту організму. Конститутивна тирозин-кіназна активність Vcr-Abl викликає порушення функції інтегринів, що призводить до аберантного вивільнення гемопоетичних стовбурових клітин з кісткового мозку кровообіг, порушення кровообігу, швидкого росту та розширення популяції попередників ХМЛ [53,56-60].

**1.1.3. Сучасні проблеми та перспективи лікування хронічної мієлоїдної лейкемії.** У XIX ст. єдиною документально підтвердженою терапією ХМЛ було вживання миш'яку (arsenic) [5]. Незважаючи на токсичність, кілька препаратів з миш'яку продовжували використовуватися до впровадження променевої терапії на початку 1900-х років. На противагу променевої терапії у 1960-х роках почали використовувати препарати з бусульфану (busulfan) та гідроксисечовини (hydroxyurea), проте вони не мали бажаного успіху [61,62]. У 1980-х роках трансплантація стовбурових клітин стала одним із головних методів лікування ХМЛ, проте через недостатність донорів була доступна лише обмеженій кількості людей [5]. Пацієнтів, яким була недоступна трансплантація стовбурових клітин, лікували інтерфероном [63]. Револьюційною подією у лікуванні ХМЛ стало відкриття інгібіторів тирозин кіназної активності онкобілка Bcr-Abl. На сьогодні існує дві стратегії інгібування тирозин кінази Bcr-Abl: АТФ-конкуруючі і аллостеричні інгібітори, які не конкурують за АТФ, а зв'язуються регуляторними ділянками активності кінази [3]. У 1998 році для клінічного лікування ХМЛ було впроваджено використання першого АТФ-конкуруючого інгібітора, здатного селективно знижувати тирозин кіназну активність онкобілка Bcr-Abl, він отримав назву іматиніб (imatinib, STI571). Насьогодні він є препаратом першої лінії для лікування пацієнтів із ХМЛ у хронічній фазі Ph<sup>+</sup> ХМЛ [65], він зупиняє прогресування захворювання на ранніх стадіях, сприяє тривалій ремісії та добре переноситься порівняно зі звичайними цитостатиками. Однак після довготривалого лікування іматинібом майже у третини хворих розвивається резистентність до препарату, а у пацієнтів, які припиняли лікування спостерігався молекулярний рецидив протягом 2 років [1,15-17,66-69]. Деякі пацієнти не реагують на лікування інгібіторами тирозин кінази з самого початку і ніколи не можуть досягти повної гематологічної, цитогенетичної або молекулярної відповіді. Це є первинною резистентністю до іматинібу [2,3,70].

Стійкість до препарату, яка виникла через певний час, в період прогресування захворювання після початкової реакції на терапію, називається

набутою стійкістю [71]. Розуміння основних причин резистентності є надзвичайно важливим кроком до боротьби із захворюванням. Зазвичай набута резистентність пов'язана з виникненням механізмів блокади цільового препарату.

Класично механізми стійкості клітин ХМЛ до інгібіторів тирозин кінази поділяють на два класи: Bcr-Abl-не залежні механізми – спричинені зниженням концентрації лікарського засобу чи активації альтернативних сигнальних шляхів та Bcr-Abl-залежні механізми – пов'язані з гіперампліфікацією онкогену Bcr-Abl, як джерела підвищеної активності кінази Abl [5]. Найчастішими причинами розвитку набутої Bcr-Abl-залежної резистентності є точкові мутації та посттрансляційні модифікації, які впливають на зв'язування іматинібу з доменом кінази Abl частини [68-72]. Для подолання резистентності було розроблено та затверджено препарати другого покоління, нілотиніб (AMN107) та дазатиніб (SKI-606), вони використовуються для першої чи другої лінії лікування, та босутиніб (SKI-606) – для другої лінії [3,73-75]. Препарати другого покоління дозволяють більш швидко і ефективно реагувати на захворювання, знижують швидкість прогресування, перехід до бластного кризу [5,76,77] і демонструють вищу ефективність проти ряду мутацій у порівнянні із іматинібом, за винятком T315I та кількох інших мутацій, які можуть проявитися у пацієнтів з Ph<sup>+</sup> ХМЛ [3,78-82]. Ці мутації було подолано лише завдяки препаратам третього покоління, серед яких єдиним схваленим інгібітором є понатиніб (AP24534) [83-87]. Проте вже відомо про появу нових мутацій (A397P,T315L) при яких навіть понатиніб неефективний [88-91]. Узагальнені дані щодо найчастіших мутацій кіназного домена онкобілка Bcr-Abl наведено в табл. 1.1. Таким чином, ефективність препаратів на основі інгібіторів тирозин кінази обмежена високим рівнем мутаційної мінливості кіназного домену Bcr-Abl.

До алостеричних препаратів належать GNF-2 і GNF-5, ці сполуки імітують миристилювання доменів Abl, що є головним механізмом регуляції кіназної активності білка за нативних умов [3]. Не дивлячись на

перспективність даного підходу, GNF-2 не отримав широкого клінічного використання оскільки теж виявився неефективним проти мутації T315I [3,92]. Препарат GNF-5 (або асцимініб, ABL001) знаходиться на стадії активного клінічного тестування [93], проте висока мутаційна мінливість кіназного домену Abl ставить під сумнів його ефективність.

*Таблиця.1.1.*

**Перелік найчастіших мутацій кіназного домена онкобілка Bcr-Abl, які викликають стійкість до препаратів АТФ-конкуруючих інгібіторів (за даними огляду [3])**

Іматиніб	Нілоти- ніб	Дазати -ніб	Босуті- ніб	Понати- ніб
M237V, L273M, F311L, E355D/G, V379I, A397P, M244V, E275K/Q, T315I, F359V/I/C, A380T, S417F/Y, L248R, D276G, F317L/V/I/C, D363Y, F382L, I418S/V, G250E/R, T277A, F359V/I/C, L364I, L384M, S438C, Q252R/H, E279K, Y342H, A365V, L387M/F, E453G/K, Y253F/H, V280A/I, M343T, L370P, M388L, E459K/V, V289A, A344V, V371A, E255K/V, V299L, M351T, E373K, Y393C, P480L, E258D, H396R/P, F486S.	Y253F/H, E255K/V, T315I, F359V/I/C	V299L, T315I, F317L/V I/C.	V299L, T315I.	A397P, T315L.

Таким чином, основними проблемами при використанні інгібіторів кінази є виникнення стійкості до препаратів, високий відсоток молекулярних рецидивів після припинення лікування, необхідність переривання лікування при вагітності через потенційний ризик для плоду, нездатність препаратів

безпосередньо витіснити Ph<sup>+</sup> стовбурові клітинами та присутність мінімального залишкового ефекту захворювання, тобто вони остаточно не виліковують ХМЛ [5]. Крім того для досягнення бажаного терапевтичного ефекту необхідний тривалий курс лікування і навіть після досягнення ремісії його не рекомендується припиняти [5,27,28].

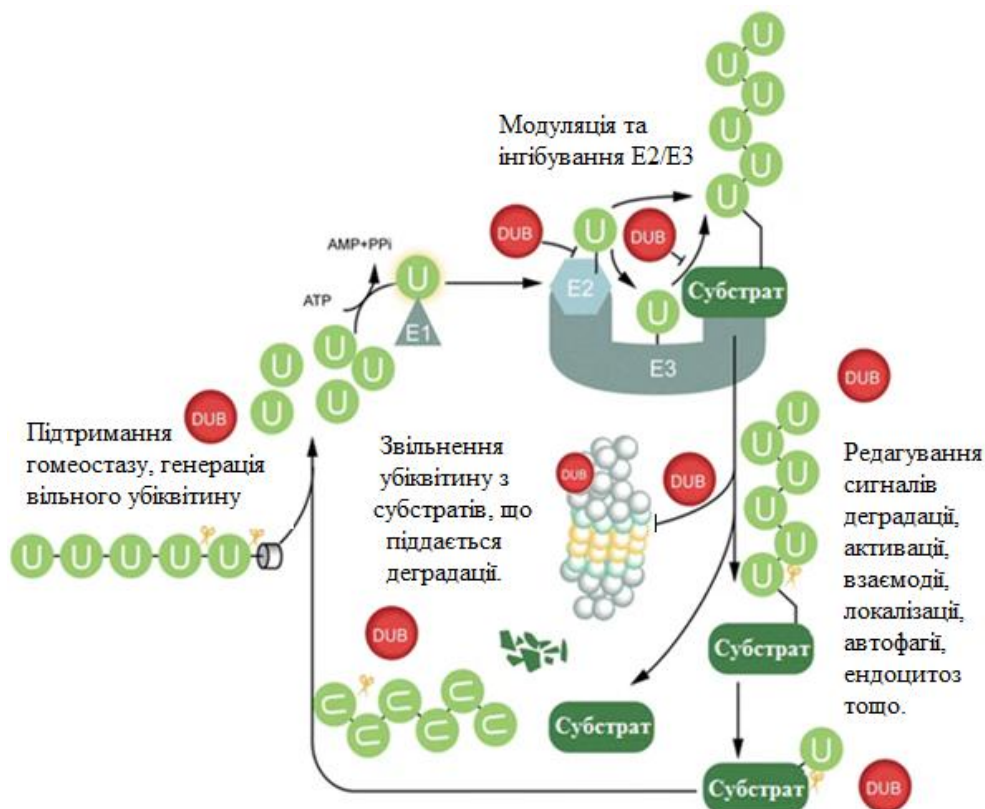
Шляхом експериментальних досліджень було запропоновано альтернативні стратегії боротьби з ХМЛ, зокрема за участю інгібіторів білка теплового шоку 90 (Hsp90), гістондеацетилаз, активаторів PP2A тощо [94-99]. Вважається, що вони здатні впливати на експресію та стабільність Bcr-Abl, проте більшість цих сполук має низьку селективність до субстрату, підвищену токсичність та потребують тривалих доклінічних випробувань [15]. Нині досить привабливою видається молекулярно-цільова терапія з використанням селективних протеаз, які здатні модулювати рівень онкобілка Bcr-Abl [15,17,100-103]. Перевагами такої стратегії терапії є низька чутливість до мутаційного процесу, можливість селективного протеолізу онкобілка Bcr-Abl за рахунок клітинних систем деградації, що сприятиме тривалій ремісії та вирішуватиме проблему мінімального залишкового захворювання у пацієнтів.

## **1.2. Убіквітин специфічна протеаза 1**

Блок убіквітин специфічна протеаза 1 (USP1) належить до родини деубіквітинуючих білків (DUB), які каталізують руйнування ізопептидних зв'язків між убіквітином і субстратом, або убіквітином і убіквітином, таким чином зворотно впливаючи на активність лігази E3 [103-106]. Динамічний баланс між активністю DUB і убіквітин E3 лігази лежить в основі модуляції активності, деградації та локалізації білків, забезпечує гомеостаз та виконання критичних функцій клітини, зокрема таких як експресія генів, прогресування клітинного циклу тощо [107-112]. Деубіквітинуючі білки беруть участь у сигнальних каскадах, які контролюють рівні метилаз та деметилаз, білків гістонів та гістон-зв'язуючих партнерів, репресорів та факторів транскрипції

[113]. Деубіквітинази можуть мати як активуючий, так і пригнічуючий вплив на транскрипцію генів залежно від їх цільових білків і типу ланцюга убіквітину, який видаляється [114]. Цікаво, що DUB можуть також інгібувати убіквітування шляхом зв'язування з лігазою E2, що перешкоджає перенесення убіквітину до лігази E3 [115]. Деубіквітинази змінюють тип убіквітування білка і таким чином впливають на його функціональні властивості, локалізацію, сприяють зміні типу деградації чи повністю унеможливають її. Зміна типу убіквітування зафіксована і при таких важливих клітинних процесах як автофагія та ентоцитоз [116-118]. Дерегуляція активності деубіквітинуючих білків пов'язана з різними захворюваннями, впливає на ріст та прогресування онкопатологій [119-125].

Узагальнена схема функціонування деубіквітинуючих ферментів представлена на рисунку 1.3.



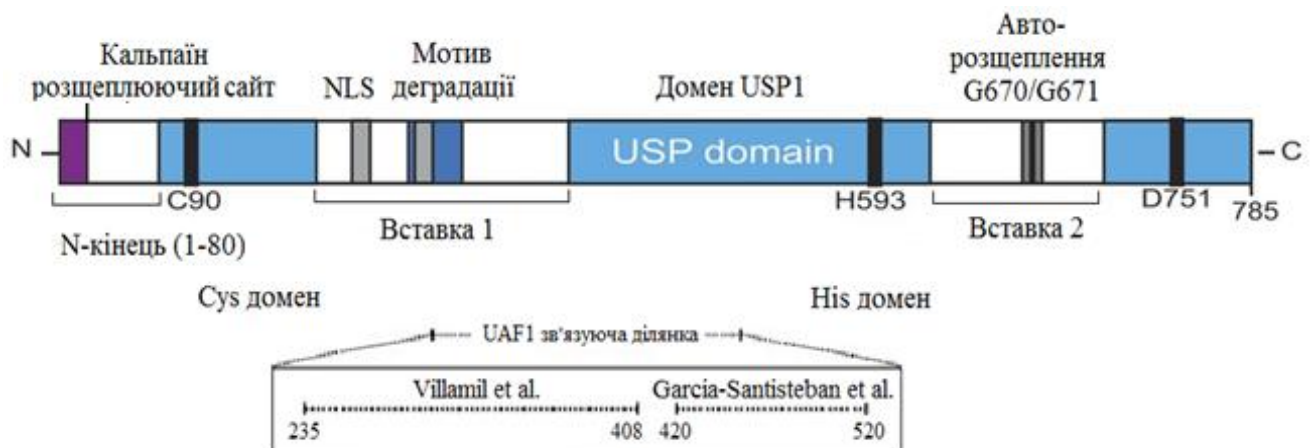
**Рис. 1.3.** Функціональні властивості деубіквітинуючих білків у клітині. DUB – деубіквітинуючі білки, U – молекули убіквітину, E1/E2/E3 – лігази. Адаптовано до [115]

У геномі людини відомо близько 100 DUB [125], за структурою доменів їх поділяють на 5 родин: убіквітин-специфічні протеази (USPs), убіквітин С-кінцеві гідролази (UCH), протеази пухлин яєчника (OTU), протеази з доменами Machado-Joseph (MJD) і металотрансферази пов'язані з JAMM/MPN доменами (JAMM) [126-128]. Перші чотири родини є цистеїновими протеазами, їх активний сайт утворений за рахунок цистеїну, гістидину та аспартату/аспарагіну, так звана каталітична тріада [121,123,129-132]. Родина JAMM – це цинк-залежні металопротеази, їх каталітичний домен містить залишки гістидину, аспартату та серину [121,134]

Білок USP1 належить до найчисельнішої і найрізноманітнішої USPs родини DUB [135]. Вперше ген *USP1* був клонований у 1998 році в Японії групою вчених на чолі з Танака К. [103]. Ген *USP1* розташований на хромосомній ділянці 1p31.3. Транскрипція гену USP1 регулюється залежно від клітинного циклу. Рівень мРНК USP1 залишається низьким протягом фази G1 і досягає піку під час фази S [103]. Білок USP1 складається з 785 амінокислотних залишків із прогнозованою молекулярною масою 88,2 кДа [103-105]. Каталітичне ядро цистеїнових протеаз складається з Cys та His доменів. Білок USP1 має один з найбільших каталітичних доменів у родині USPs за рахунок двох додаткових ділянок [129]. Перший додатковий домен знаходиться між 2 та 3 боксом, він містить мотив деградації (дегрон), один із найбільш вивчених сайтів фосфорилування (S313) та два сигнали ядерної локалізації (NLSs) [136]. Другий додатковий домен знаходиться між 5 та 6 боксами і включає сайт авторозщеплення (G670-G671). Каталітичний домен USP1 містить N-кінцевий Cys домен з C90 каталітичним залишком та С-кінцевий His домен з H593 та D751 каталітичними залишками (рис. 1.4.). Вважається, що саме ці три амінокислоти утворюють так звану каталітичну тріаду, яка формує каталітичне ядро фермента [104,136-139].

Вважається, що комплекс USP1/UAF1 утворюється у цитоплазмі і згодом імпортується до ядра за рахунок NLS ділянки USP1 білка [104]. Білок UAF1 виконує роль кофактора, він стабілізує USP1 та аллостерично збільшує його

каталітичну активність, яка є низькою без його участі [136,140-141]. Дефіцит кофактора UAF1 спричиняє загибель мишей в ембріональний період [139]. Досі остаточно не з'ясовано, який саме сайт USP1 відповідає за зв'язування з кофактором, літературні дані з цього приводу суперечливі [104]. За результатами коїмунопреципітації та тесту клітинної релокації з використанням GFP-злитого USP1 білка визначено 420-520 сайт, в той час як результати пул-даун аналізу та бактеріальної експресії з використанням GST-злитого USP1 білка свідчать про участь 235-408 сайту у зв'язуванні з кофактором UAF1 [104,140]. Остаточно вирішити це питання можна буде лише після отримання тривимірної структури USP1, не виключено, що у зв'язуванні беруть участь два вище зазначені сайти.



**Рис. 1.4.** Будова білка USP1. Відображено розташування Cys, His доменів, а також місце кальпайн зв'язуючого сайту, сигнали ядерної локалізації (NLS), UAF1 зв'язуючі ділянки (235-408 а.к. та 420-520 а.к.), мотив деградації білка, сайти авторозщеплення (G670/G671) тощо. Адаптовано до [104,140]

Кофактор UAF1 є не єдиним механізмом регуляції USP1 білка. Відомі інші принципи, регуляції рівня експресії USP1, його каталітичної активності, локалізації, деградації тощо. Критичною подією в регулюванні ферментативної активності білка USP1 є його фосфорилування за сайтом Ser313



циклінзалежними кіназами (CDK) [103]. Вважається, що фосфорилування сайту Ser313 регулює рівень білка USP1, який залежить від фази клітинного циклу, запобігаючи його деградації в мітозі [142]. Також повідомляється, що фосфорилування Ser313 сприяє взаємодії USP1 з кофактором UAF1 [136].

Рівень USP1 білка регулюється шляхом протеосомної деградації. Мотив деградації (дегрон) забезпечує APC/CCdh1 залежну деградацію білка USP1 під час G1 [103]. Рівень білка USP1 знижується в клітинах, які піддаються впливу генотоксичних агентів (зокрема, таких як УФ) шляхом авторозщеплення за внутрішнім мотивом Gly670-Gly671 [143]. Авторозщеплення USP1 призводить до утворення двох амінокислотних фрагментів, а саме аміно-термінального фрагменту (USP1NT) і більш короткого карбоксил-термінального фрагменту (USP1CT), які в подальшому підлягають протеосомній деградації [136]. На відміну від незворотного руйнування USP1, спричиненого впливом ультрафіолетовим випромінюванням, ROS викликає оборотну інактивацію цистеїнових протеаз DUBs, в тому числі і білка USP1. Інактивація деубіквітинуючих ферментів за допомогою ROS є результатом окислення їх каталітичного залишку цистеїну [144]. Таким чином, деубіквітинуючі ферменти виступають посередниками клітинної відповіді на окислювальний стрес. Миші з низьким рівнем USP1, невеликі, схильні рано померати і мають численні дефекти, зокрема такі як остеопенія, безпліддя та нестабільність геному [137].

У базі даних “Каталог соматичних мутацій онкозахворювань” (COSMIC) знаходяться відомості про понад тридцять мутаційних помилок в USP1, функціональний ефект яких до кінця не з'ясований [136]. Більшість мутацій USP1 пов'язані з поодинокими замінами амінокислот. Так мутація будь-якого з C90, H593 чи D751 амінокислотних залишків значно знижує каталітичну активність білка USP1. Детектовані й мутації G667A, L669P, K673T і A676T, які розташовані поруч або безпосередньо в G670/G671 ділянці авторозщеплення білка [136,142]. Мутації USP1 знайдені і при деяких видах раку людини, але функціональні наслідки цих мутацій залишаються невідомими [145].

USP1 має широкий спектр клітинних субстратів, він деубіквітинує PCNA білок, цим самим забезпечує стабільність геному, оскільки убіквітинування PCNA, яке відбувається після зупинки прогресування реплікаційної вилки в результаті пошкодження ДНК, полегшує утворення комплексу TLS полімераз, які за рахунок низької точності синтезу можуть обійти ураження і збільшити відсоток мутагенезу [139,140]. Шляхом деубіквітинування білків FANCD2 та FANCI, білок USP1 відіграє ключову роль у підтримці генетичної стабільності при анемії Фанкомі, рідкісному спадковому порушенні, з прогресуючою недостатністю кісткового мозку, геномною нестабільністю та підвищеною чутливістю до онкопроцесів [146]. USP1 бере участь у відновленні дволанцюгових розривів ДНК шляхом гомологічної рекомбінації, проте молекулярний механізм, що лежить в основі цієї функції, нині до кінця не зрозумілий. Інгібування USP1 викликає накопичення ub-FANCD і сприяє виникненню онкогенного старіння [139,146]. Видаляючи ланцюг убіквітину, USP1 стабілізує білки ID1, ID2 і ID3, які є негативними регуляторами основних факторів транскрипції типу спіраль-петля-спіраль (bHLH). При остеосаркомі, білок USP1 запобігає диференціації клітин шляхом деубіквітинування та стабілізації білка ID2 [147]. Білок USP1 безпосередньо деубіквітинує Akt кіназу, що запобігає її фосфорилуванню та призводить до інактивації. Наслідком цього є порушення PI3K-Akt-FoxO-mTOR сигнального шляху, який контролює ріст і метаболізм у всіх клітинах [137]. siRNA опосередкований нокдаун білка USP1 викликає зниження рівня кінази ULK1, яка є ключовим регулятором процесу аутофагії [148]. Показано, що USP1 регулює дуплікацію центросом, дерегуляція USP1 може викликати формування аномального мітотичного веретена, ампліфікацію центросом, неправильну сегрегацію хромосом, що призводить до анеуплоїдії, нестабільності геному, таким чином створюючи передумови для онкогенній трансформації клітин [140,142,146]. Гіперактивація білка USP1 сприяє процесу метастазування при ракові молочної залози та корелює з поганим прогнозом для хворих. USP1 підсилює експресію ряду прометастатичних генів у клітинах раку молочної залози, сприяє міграції

клітин та інвазію *in vitro* та полегшує процес метастазування легенів. USP1-опосередковане деубіквітинування та стабілізація білка KPNA2, запускає низку сигнальних шляхів, які й лежать сприяють процесу метастазування [149]. Підвищений рівень USP1 спостерігається також при остеосаркомі, меланомі, ракові шийки матки, легенів і шлунка, має онкогенну роль при прогресуванні мієломи, гліобластоми та лейкемії [150]. При онкопатологіях передміхурової залози USP1 деубіквітує білок KDM4A таким чином впливаючи на проліферацію ракових клітин [151]. Вважається, що USP1 може виступати в якості терапевтичної мішені при раку передміхурової залози, оскільки його інгібування зменшує проліферацію ракових клітин та сприяє кращій реакції на лікувальні препарати. Також пропонується використовувати USP1 як потенційну мішень для лікування недрібноклітинного раку легені [150]. Традиційно при терапії раку використовують генотоксичні препарати на основі платини, такі як цисплатин або оксаліплатин. Однак пошкодження ДНК, викликане цими агентами, може призвести до активації шляхів відновлення ДНК, що призводить до стійкості ракових клітин до хіміотерапії. Інгібування USP1 сенсibiliзує ракові клітини до опромінення та підвищує чутливість до різних хіміотерапевтичних засобів, тому орієнтація на комплекс USP1/UAF1 може бути новим підходом для подолання резистентності до широко застосовуваних хіміотерапевтичних препаратів [104,128,152].

На сьогодні відомо декілька хімічних сполук, які інгібують функцію USP1, як *in vitro*, так і *in vivo*. У 2011 році ідентифіковано перші інгібітори білка USP1 – пімозид та GW7647 [136,152]. Пінозид належить до затверджених антипсихотичних препаратів та використовується при лікуванні пацієнтів уражених синдромом Туретта [152]. І хоча пінозид і GW7647 демонструють хороше клітинне інгібування білка USP1, обидві сполуки можуть проявляти активність до інших білків. Так зокрема, пінозин, окрім білка USP1 може інгібувати USP2, USP5, USP7, USP8, USP46 білки. У 2013 році виявили SJB2-043 інгібітор білка USP1, застосування якого супроводжується зниженням рівня ID2 та ID3 білків, гальмуванням росту лейкемічних клітин та апоптозу клітин

K562 залежно від дози інгібітора [153]. У 2014 році розроблений новий наномолекулярний, високоселективний інгібітор USP1/UAF1 комплексу – ML323, з відмінною селективністю до інших деубіквітиназ людини (DUBs), споріднених протеаз тощо [154]. Відомо, що ML323 індукує вірусну реплікацію в умовах *in vitro* та *in vivo*, а також виступає потенційним кандидатом при лікуванні ревматоїдного артриту та системного червоного вовчаку. Крім того, ML323 знижує здатність клітин відновлювати ДНК, підвищує чутливість клітин до цисплатину при остеосаркомі та недрібноклітинному раку легенів [155]. Інгібування білка USP1 за допомогою пінозиду та ML323 викликає пригнічення метастазування при раковій молочної залози у мишей [148]. Таким чином, деубіквітинази USP1 видається перспективною терапевтичною мішенню при різних онкопатологіях, хоча переважна більшість його білкових субстратів, загалом як і механізмів впливу на них, залишається не зрозумілим і потребує детального вивчення.

### 1.3. Гольджі глікопротеїн 1 (GLG1)

Білок гольджі глікопротеїн 1 (GLG1), також відомий як гольджі сіалоглікопротеїн (MG-160), E-селектин ліганд 1 (ESL-1) та цистеїн багатий рецептор до фактору росту фібробластів (CFR-1), належить до інтегральних білків комплексу Гольджі [156,157]. Ген *GLG1* локалізується на ділянці хромосом 16q22-23. Білок GLG1 складається з 1150 амінокислот, у його будові виділяють трансмембранний (позаклітинний) домен, цитоплазматичний хвіст, цистеїн багаті домени, гепарин зв'язуючий домен та сигнальний пептид (рис.1.6.). Трансмембранний домен складається із 21 амінокислотного залишку, 16 серед яких це цистеїн багаті консервативні повтори (aa 116-1101) та 5 потенційних сайтів N-глікозилювання [158,159]. Ідентичність амінокислотних залишків трансмембранного домену зберігаються у людини, щурів, мишей та курчат. Цитоплазматичний хвіст складається з 13 амінокислотних залишків [158]. Білок GLG1 локалізується у комплексі Гольджі, зокрема в його цис-, та

медіальних цистернах, у транс-цистернах зустрічається рідко [160]. У деяких типах клітин білок GLG1 локалізуватися переважно на мембрані, особливо добре це виражено у клітин 32Dc13, нейтрофілах і лейкоцитах [161]. У комплексі Гольджі білок GLG1 є стабільним в той час як поза комплексом досить нестійкий [162]. Вважається, що утримання білка GLG1 у комплексі Гольджі відбувається за рахунок С-термінальної області, зокрема аргініну у положенні 1171 [162]. Помічено, що делеція 1-9 залишків з 13 амінокислот С-кінцевого домену, або заміна основної кінцевої амінокислоти аргініну на аланін може спричинити мембранну локалізацію білка. Ще однією причиною переміщення білка на мембрану клітини може бути протеолітична модифікація С-кінцевого домену [158]. Деякі автори припускають, що утримання GLG1 у комплексі Гольджі відбувається за рахунок взаємодії з іншими інтегральними білками Гольджі [163]. Підтвердженням цієї гіпотези може бути здатність білка GLG зв'язувати білки з широкою специфічністю (наприклад, FGF, Е-селектин і TGF- $\beta$ -комплекс) [163,164,165]. Здатність утримуватися у комплексі Гольджі, може вплинути ліганд-зв'язуюча активність білка, наприклад, функція GLG1 як ліганду Е-селектину вимагає специфічного фукозилювання [166].

Узагальнена схема будови білка GLG1 представлена на рисунку 1.5.

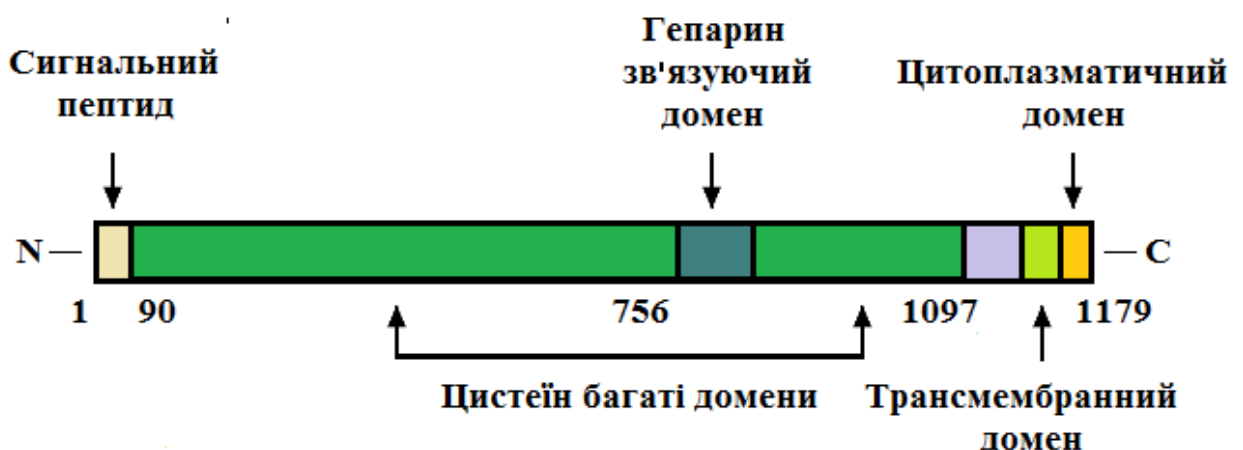


Рис. 1.5. Топологія білка GLG1

Припускається, що регульоване фукозилювання домену GLG1 разом із збільшенням афінності для E-селектину може призвести до втрати спорідненості до білків комплексу Гольджі [158]. Деякі автори вважають, що локалізуючись у комплексі Гольджі, білок GLG1 виконує функцію шаперону, зокрема для факторів росту фібробластів [166]. Локалізація білка GLG1 на мембрані відбувається за рахунок його коротких цитоплазматичних сегментів [158]. Цікаво, що при онкопатологіях білок GLG1 локалізується майже виключно в комплексі Гольджі [165].

Відомо декілька ізоформ білка GLG1, відносна кількість мРНК яких відрізняється клітинно-специфічним чином [166]. Найбільший розмір має перша ізоформа білка GLG1. У ізоформи два відсутній один з доменів у порівнянні з першою. Найменший розмір має ізоформа три, за рахунок короткого С-кінця. Найбільш вивченою є ізоформа, що має унікальний цитоплазматичний домен з 24 амінокислотних залишків [166]. Дана ізоформа отримала назву GLG2. Генетичні дослідження показали, що білки GLG1 і GLG2 є продуктами одного і того ж гена, варіанти мРНК GLG1 та мРНК GLG2 є результатом альтернативного сплайсингу [166].

Вважається, що альтернативний сплайсинг гена *GLG1* може регулювати функції білка GLG1. Активність сплайсингу відрізнялася у різних тканинах та клітинних лініях, так деякі клітини демонстрували різні співвідношення транскрипції GLG1 і GLG2, але в жодному випадку не було експресії лише одного транскрипту. У HL60, G361 клітинах меланоми та HeLa кількість транскриптів GLG1 і GLG2 є приблизно однаковою [159,166]. В той час як Molt 4, K562, SW480 та A549 значно більше транскрибується GLG1 [157].

GLG1 є мультилігандним зв'язуючим білком, виступає в якості внутрішнього-гольджі-рецептора для факторів росту фібробластів FGF (FGF-1, -2, -4, -18 і можливо -3) і лігандів, що опосередковують взаємодії між клітинами [159,163]. Високий ступінь еволюційної консервативності серед хребетних GLG1 та його здатність зв'язуватися з різними FGF з високим ступенем спорідненості свідчать, що цей унікальний рецептор відіграє важливу роль у

біології FGF [167]. У ряді робіт показано, що клітинні лінії лейкемії мають рецептори, які специфічно зв'язують FGF і цим підтверджують гіпотезу, що FGF діють безпосередньо на певні клітини крові, щоб стимулювати їх проліферацію [163]. Цікаво, що амінокислотна послідовність самого білка GLG1 на 94% ідентична (понад 1078 амінокислот) до рецептора росту факторів фібробластів [167]. У клітинах крові білок GLG1 взаємодіє з білком PSGL-1, що забезпечує зв'язування лейкоцитів з поверхнями ендотеліальних клітин [157]. Білок GLG1 є одним із лігандів E-селектину, активність зв'язування з яким опосередкована фукозилтрансферазами Fut3/Fut6 [166,168]. Вважається, що білок GLG1 може допомагати у зв'язуванні E-селектину з мієлоїдними клітинами та клітинами метастазів при ракові передміхурової залози людини [158]. У метастазуючих клітинах РСa спостерігається підвищений рівень експресії E-селектину та білка GLG1 [157]. Нещодавно ідентифікували взаємодію білка GLG1 з білками BIG1 і Arf-GEF, які необхідні для ініціювання утворення мембранних везикул [165]. Суперекспресія білка GLG1 полегшує метастазування при раку передміхурової залози та пухлинах кісток [157, 168]. Надмірна експресія білка активізує каскад Ras-MAP-кіназ та індукує експресію генів білків родини Rho, що є необхідною умовою для клітинного метастазування клітин [157]. В той час як інгібування білка GLG1 змінює архітектуру комплексу Гольджі, знижує рівень білка інтегрину  $\beta 1$  і зменшує міграцію у ряді пухлинних клітин [165].

#### **1.4. Білок цинкового пальця 217**

Білки цинкового пальця (ZNF) були відкриті наприкінці 1980-х років та класифіковані як фактори транскрипції, специфічні до послідовностей промоторів енансерів/сайленсерів ДНК-зв'язуючі білки, здатні рекрутувати регуляторні фактори клітини, зокрема ферменти, що модифікують гістони для активації та вимкнення генів [169]. Зв'язування ДНК-специфічної послідовності досягається за рахунок різноманітних структурних доменів. На сьогодні білки

цинкового пальця є найбільшою родиною факторів транскрипції в геномі людини [170], вони виконують центральну роль у регуляції експресії генів та численних біологічних процесів, зокрема таких як проліферація, диференціювання, метаболізм, апоптоз, аутофагія [169-171]. ZNF можуть працюючи як репресори і активатори транскрипції [171]. Зазвичай білки цинкового пальця зв'язуються з послідовністю ДНК, проте можуть взаємодіяти із молекулами РНК, білками та ліпідами [169,171].

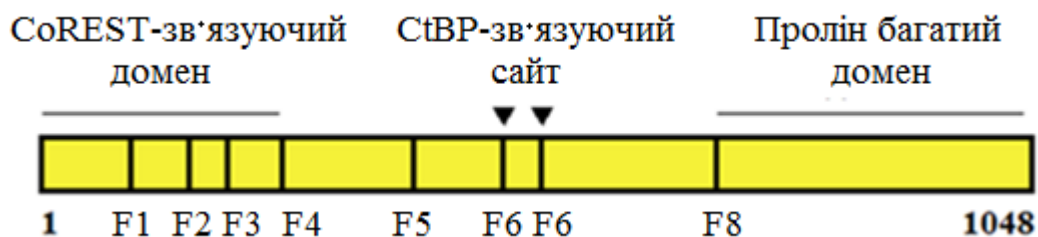
Фактори транскрипції поділяють за характером доменів, які розпізнають ДНК, так виділяють класичні цинкові пальці C2H2 типу, гомеодомени, “лейцинові блискавки”, спіраль-петля-спіраль, домени ядерних рецепторів та MADS бокси [172]. У класичних білках цинкового пальця C2H2-типу два цистеїни в одному ланцюзі та два гістидини в іншому координуються іоном цинку [169]. Кристалографічні дослідження показали, що класичні цинково-пальцеві домени мають два  $\beta$ -листи та одну  $\alpha$ -спіраль [173]. Некласичні типи ZNF мають відмінності у цистеїн/гістидинових комбінаціях. З розвитком молекулярно генетичних методів було відкрито нові функції білків ZNF, з'ясовано, що вони можуть виступати в ролі рекрутерів модифікаторів хроматину, як кофактори, або як структурні білки, що беруть участь у міграції клітин та інвазії [169]. У організмів співвідношення типів транскрипційних факторів відрізняється. Виділяють кілька причин, появи великої різноманітності ZNF в еволюційному процесі, зокрема, вони мають невелику структуру, а їх фолдинг залежить від невеликої кількості залишків [173]. Крім, того ці домени зв'язуються ДНК модульним способом, що дозволяє певні зміщення і сприяє появі білків з новими ДНК-специфічними ділянками за рахунок утворення додаткових цинкових пальців. Саме тому цинкові пальці використовуються для створення штучних факторів транскрипції та нуклеаз із новими властивостями [174].

Білок цинкового пальця 217 (ZNF217), відомий також як білок цинкового пальця 117, h-PLK та білок цинкового пальця HRF9, належить до класичних цинкових пальців C2H2-типу [171,175-177]. Загалом за кодування білків



цинкового пальця відповідає близько 2% генів у геномі людини [169]. Ген *ZNF217* локалізується на хромосомній ділянці 20q13.2, яка часто ампліфікуються при онкопатологіях [175,178]. Окрім гена *ZNF217* у даній хромосомній області виявлено кілька копій онкогенів, які надають селективні переваги раковим клітинам. кДНК повнорозмірного гена *ZNF217* має дві відкриті рамки зчитування, завдяки альтернативному сплайсингу четвертого екзону. Таким чином утворюється два білки – 1,062 і 1,108 амінокислоти. Кожен передбачуваний білок має вісім класичних C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> цинкових пальців та домен, багатий проліном [172,175]. Вважалося, що для розпізнавання ДНК-специфічної послідовності необхідний тандем з трьох пальців білка, розділених характерними TGERP-ланками. Проте значна кількість білків цинкового пальця не має ознак трьох пальців цього типу [175]. У *ZNF217* основну роль у розпізнаванні ДНК виконують шостий і сьомий пальці. Показано, що конструкція, яка включає пальці 6 і 7 *ZNF217* здатна зв'язувати вісім пар нуклеотидів ДНК у визначеному порядку (рис. 1.6.) [172,175,177].

Узагальнена схема будови білка *ZNF217* представлена на рисунку 1.6.



**Рис 1.6.** Топологія білка *ZNF217*. Представлені цинкові пальці білка (F1-F8), CoREST-зв'язуючий домен, CtBP-зв'язуючі сайти та пролін багатий домен білка *ZNF217*

*ZNF217* є компонентом комплексу гістонової деацетилази людини, та утворює комплекс з транскрипційним корепресором С-кінцевого зв'язуючого білка (CtBP), гістоновою деметилазою LSD1 та KDM5B/JARID1B / PLU-1,

метилтрансферазою G9a та EZH2. Найбільш вивчена його участь у комплексі з CoREST, HDAC2 і BHC110/LSD1 [179]. Припускається, що ZNF217 може порушувати баланс між метилюванням та деметилюванням, що необхідно для координації транскрипції [172,175]. При онкопатологіях ZNF217 понаднормово експресується, що може впливати на регуляцію генів, порушуючи функцію інших факторів транскрипції, які за нормальних умов потребують корепресорів, таких як CoREST [179]. ZNF217 зв'язує особливий цис-елемент CAGAAC, і за рахунок цього пригнічує промотор E-кадгерину у геномі людини [172], який є важливою молекулою клітинної адгезії, зниження експресії E-кадгерину, вважається ознакою епітеліально-мезенхімального переходу і спостерігається під час прогресування пухлини більшості карцином [180].

Таким чином, репресія E-кадгерину за участі ZNF217 білка, імовірно, знижує міжклітинні контакти, що характерно для онкопроцесу та підвищує метастатичний потенціал. ZNF217 може позитивно регулювати експресію конкретних цільових генів, таким чином виступаючи в ролі складного, двостороннього регулятора транскрипції [175,179]. ZNF217 контактує з C-кінцевими зв'язуючими білками (CtBP), багатофункціональними білками, які залучені до регуляції генів, підтримання комплексу Гольджі, утворення синаптичних контактів та може служити копрепресором для декількох класів факторів транскрипції [177]. ZNF217 взаємодіє з білком CtBP за рахунок PXDLS та RRTGCPPAL мотивів своєї послідовності [175,177]. ZNF217 здійснює репресію генів шляхом рекрутування CtBP та пов'язаного з ним репресійного комплексу [181].

Регуляція експресії та функцій ZNF217 здійснюється шляхом метилювання промотора ZNF217 за участі кількох мікроРНК (miR-203, miR-200c, miR-24), спрямованих на 3'UTR мРНК ZNF217 [182]. До найбільш вивчених пострансляційних модифікацій білків цинкового пальця залежать процеси фосфорилювання і ацетилювання [171]. Відомо, що близько 50% пептидних лінкерів у 80% ZNF типу C2H2 є фосфорильованими за залишками серину або треоніну [171,175]. Фосфорилювання ZNFs – це координований

процес, який запобігає контакту білків ZNF з ДНК під час мітозу [171]. ZNF мають вирішальну роль у тканинному гомеостазі, відіграючи ключову роль у розвитку та диференціації різних тканин [169,171]. Показано, ZNF217 зв'язується з промоторами генів, які беруть участь у диференціації та розвитку органів [175,181]. Порушення у функціонуванні ZNF є причиною різних захворювань, зокрема таких як нейродегенерація, захворювання шкіри, діабет [171,175,]. Недавні дослідження підтвердили участь ZNF у виникненні та прогресуванні онкопатологій [175,184]. Тому, розробка лікарських препаратів, спрямованих на експресію або активність ZNF білків C2H2 типу, є перспективним напрямом для терапії раку на різних стадіях прогресування [171]. Завдяки співпраці з гістоною деметилазою, білок ZNF217 є прямим репресором BRCA1, людським геном-супресором пухлин, який відповідає за репарацію ДНК [185]. ZNF залучається до злоякісної трансформації клітин через функцію фактора транскрипції та можуть виступати в ролі рекрутерів модифікаторів хроматину або білків, які регулюють міграцію та інвазію трансформованих клітин, таким чином беручи участь у всіх основних етапах прогресування злоякісного процесу від утворення злоякісної клітини до метастазів [169,171]. Все більше досліджень фіксують участь ZNF217 у внутрішньоклітинних сигнальних шляхах, які лежать в основі перепрограмування клітин та процесі онкогенезу, ZNF217 впливає на одну з найважливіших властивостей ракових клітин, а саме здатність підтримувати хронічну проліферацію за рахунок дерегуляції сигналів, що дозволяє прогресувати через клітинний цикл, ріст клітин і порушувати антипроліферативну сигналізацію [175,184,185]. Показано, що ZNF217 перешкоджає апоптотичному шляху на ранніх стадіях прогресування пухлини, порушуючи апоптотичні сигнали, внаслідок дисфункціонування теломерів [186]. Ектопічна експресія ZNF217 активує PI3K/Akt шлях, що стає ще однією причиною антиапоптотичного ефекту [175]. В той час як інгібування активності викликають зниження фосфорилування Akt. В клітинах злоякісних пухлин різного походження збільшення кількості копій ZNF217 асоціюється з поганим прогнозом для пацієнтів, він сильно стимулює міграцію, інвазію та ріст клітин

[187]. Надмірна експресія ZNF217 в умовах *in vitro* сприяє проліферації клітин в яєчниках і клітинах раку молочної залози, тоді як інгібування експресії ZNF217 знижує проліферацію ракових клітин простати, яєчника, молочної залози [175]. Конститутивна експресія ZNF217 *in vivo* у клітинах раку молочної залози або яєчників стимулює ріст і швидкість утворення пухлини [188]. Високий рівень проліферації клітин із надмірною експресією ZNF217 корелює із значним збільшенням клітин у S фазі, аберантною експресією циклінів та підвищенням експресії Aurora-A (Aurora kinase A /AURKA /STK15) [175]. Посилена експресія ZNF217 у нормальних епітеліальних клітинах молочної залози або клітинах раку молочної залози прискорює утворення мамосфер [189]. Експресія ZNF217 дерегульована в стійких до ендокринної терапії клітинах раку молочної залози. За результатами RTQ-ПЛР встановлено, що високі рівні мРНК ZNF217 при раку молочної залози корелює з меншою виживаністю пацієнтів та розвитком метастаз [175]. Показано, що однонуклеотидні поліморфізми rs1056948 (SNP) у 3' UTR ZNF217 та SNP rs61730988 сприяють розвитку раку молочної залози. Першою прямою мішенню для ZNF217 як фактора транскрипції був визначений ген ErbB3 [189]. ZNF217 може викликати надмірну експресію білка ErbB3 в нормальних епітеліальних клітинах молочної залози людини та в клітинних лініях раку молочної залози, рівні експресії ZNF217 та ErbB3 корелюють з розвитком пухлин молочної залози людини [175,189]. Ще однією мішенню транскрипційного комплексу за участю білка ZNF217 є супресор пухлин *p15<sup>ink4b</sup>*, який інгібує прогресію клітинного циклу при переході G1/S [175]. Важливо, що надекспресія ZNF217 є достатньою умовою для пошкодження TGF- $\beta$ -залежного антипроліферативного шляху, за рахунок інгібування ряду кофакторів, які беруть участь у деметилуванні гена *p15<sup>ink4b</sup>*. Порушення TGF- $\beta$ -шляху за участі ZNF217 сприяє прогресуванню злоякісних новоутворень за рахунок порушення антипроліферативних механізмів [188]. Транскриптомічний аналіз показав, що дерегуляція експресії ZNF217 характеризується аберантною експресією ферментів, які беруть участь у метаболізмі ліпідів, шляхом порушення функціонування

лізофосфатидилхолінової ацилтрансферази 1, що має місце при прогресуванні раку молочної залози та метастазуванні [188,189].

На пізніх стадіях онкопроцесу ZNF217 сприяє виникненню стійкості до хіміотерапії, зокрема до таких препаратів як доксорубіцин та паклітаксел, в той час як інгібування досліджуваного білка підвищує чутливість до цих препаратів [188]. При колоректальному раку інгібування ZNF217 знижує міграцію клітин та інвазію [175]. Для субпопуляцій стовбурових клітинах гліоми характерний високий рівень мРНК ZNF217 у порівнянні з нормальними тканинами, що асоціюється з поганим прогнозом для пацієнтів [190]. Інкубоване диференціювання субпопуляцій стовбурових клітинах гліоми, що знижувало регуляцію ZNF217, яка включала нокдаун регуляцію ZNF217, супроводжувалась інгібуванням проліферації стовбурових клітинах гліоми і зменшенням популяції стовбурових клітин [189-191]. мРНК та білок ZNF217 були надмірно експресовані при раку простати порівняно з нормальною тканиною передміхурової залози та у тканинах колоректальної карциноми [191]. Шляхом імуногістохімічного аналізу виявлено підвищений рівень білка ZNF217 в пухлинній тканині раку шийки матки у порівнянні з умовно нормальною суміжною тканиною. Для багатьох пухлин людини характерні геномні аберації в локусі ZNF217, що дає чіткі докази втрати контролю над цілісністю геному [175].

На сьогодні, трицирибін (також відомий як API-2) є єдиним препаратом, що протидіє несприятливим ефектам ZNF217 і запропонований в якості клінічної стратегії лікування хворих на рак [175,189]. Результати аналізу показують, що трицирибін інгібує синтез ДНК і алостерично блокує активацію АКТ. У клітинах раку молочної залози трицирибін долає стійкість до доксорубіцину, спричинену ZNF217 [189]. Альтернативним підходом до інгібування ZNF217 *in vivo* є використання міРНК (miR-200c), що проявило ефективність у зниженні метастазування при раку молочної залози [192] та підтвердило перспективність його вивчення при різних формах злоякісних новоутворень.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Матеріали та обладнання

У роботі було використано наступні буферні системи та розчини: 10x буфер Pfu+MgSO<sub>4</sub> (Thermo Scientific, США), 10x амонійний буфер (160 mM NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 650 mM Tris pH 8,8), тріс-ацетатний буфер (40 mM Tris, 20 mM CH<sub>3</sub>COOH, 1 mM ЕДТА, pH 8,3), буфер для виділення плазмідної ДНК, неіонний детергент ND (5% сахароза, 0,5M ЕДТА, Tris pH 8,0, 0,75M NH<sub>4</sub>ClO, 5% Triton X-100, лізоцин 100 мкг/мкл, РНКаза мкг/мкл ), буфер для адсорбції фрагментів ДНК з агаризованого гелю (5M GuSCW, MES pH 5,5, 20 mM ЕДТА, 0,5% Triton X-100), буфер для очищення ДНК, Hinh Salt Wash Solution (50 mM тріс pH 7,5, 10 mM ЕДТА, 0,2M NaCl<sub>2</sub>, 50% Eton) та Low Salt Wash Solution (10 mM тріс pH 7,5, 1 mM ЕДТА, 0,1M NaCl<sub>2</sub>, 50% Eton), буфер для лізису еукаріотичних клітин NP40 (150 mM NaCl, 1,0% тритон X100, 50 mM тріс-HCl pH 8,0, 1 mM PMSF, 2 mM NaVO<sub>3</sub>), 10X буфер Tango “Thermo Scientific” (США), фосфатний буфер PBS (NaCl 140 mM, Kcl 2,6 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, pH 7,4), буфер TBST (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20), розчин CaCl<sub>2</sub> (0,1 M CaCl<sub>2</sub>, 15% гліцерину), розчин акриламиду (акриламід 29%, біс акриламід 1%), тріс-гліциновий буфер (25 mM тріс, 250 mM гліцин, 0,1% SDS), буфер для електропереносу білків (25 mM тріс, 250 mM гліцин, 0,4% SDS, 20% метанол), буфер для очищення білків (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 20mM імідазолу, pH 8,0), елюційний буфер (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 250mM імідазолу), буфер для нанесення зразків з b-MeEtOH (200mMTris-HCl, pH 6,8, 400mM b-MeEtOH, 4% SDS, 0,01% бромфенол синій, 40% гліцерину), ECL буфер А (100 mM Tris-HCl, pH8.5, 2,5 mM люмінал, 0.4 mM кумарова кислота), ECL буфер Б (100 mM Tris-HCl, pH8,5,

0.023% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), середовище для заключення препаратів CitiFluor™ AF1, Mounting Medium (Science Services, Німеччина).

Під час роботи з бактеріальними культурами використали поживне середовище LB Broth, Miller, (Amresco, США), агар (Sigma-Aldrich, США), 100 мг/мл ампіцилін (Артеріям, Україна), 50 мг/мл канаміцин (Артеріям, Україна). Культивувацію бактеріальних клітин проводили у шейкер-інкубаторі ES-20 (Biosan, Латвія). Для культивувації клітин K562 використали поживне середовище RPMI (Thermo Scientific, США), для клітин 293T поживне середовище DMEM «Thermo Scientific» (США), ембріональну сироватку великої рогатої худоби (Biowest, Франція), трипсин (Thermo Scientific, США), 50 одиниць/мл пеніциліну (Артеріум, Україна), 100 мкг/мл стрептоміцину (Артеріум, Україна). З культурами клітин працювали у ламінарному боксі II класу захисту (ESCO, Німеччина). Культивування клітин проводили у CO<sub>2</sub>- інкубаторі (Binder, США). Для відбору клітин K562, отримання лізатів клітин та під час інших молекулярно-генетичних маніпуляцій використали мікроцентрифугу Epp 5415R (Eppendorf, Німеччина). Морфологічні дослідження клітин проводили за допомогою інвертованого мікроскопа XD-50T (ULAB, Великобританія) з функцією фазового контрасту. Імунофлюоресцентний аналіз здійснили за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа Zeiss LSM510 (Німеччина). Електрофоретичне розділення нуклеїнових кислот здійснили за допомогою камери для горизонтального електрофорезу «Helicon» (Росія). Візуалізацію гелевої пластинки провели на транслюмінаторі Vilber Lourmat (Sigma, США). Для електрофоретичного розділення білків у поліакриламідному гелі та електрофоретичного перенесення білків використали камеру для вертикального електрофорезу (BioRad, США). Хемолюмінесцентну детекцію мембрани здійснили на приладі Molecular Imager ChemiDoc XRS+ (BioRad, США). Молекулярно-генетичні маніпуляції виконані за допомогою піпет-дозаторів (Eppendorf, Німеччина). Під час досліджень використали сертифікований для роботи у біологічній лабораторії пластиковий та скляний посуд.

## 2.2. Використані у роботі ферменти

Pfu DNA полімераза (Fermentas, Литва), T4 DNA лігаза (Fermentas, Литва), T4 полінуклеотид кіназа (Promega, США), FastAP (ThermoFisher Scientific, США) та ендонуклеази рестрикції: SmaI (Biometra GmbH, Germany), KpNI (ThermoFisher Scientific, США) і SalI (ThermoFisher Scientific, США).

## 2.3. Використані в роботі антитіла

*Первинні антитіла:* anti-USP1 (PA5-55852, ThermoFisher Scientific, США), anti-Bcr-Abl (MA1-153, Thermo Fisher Scientific), anti-Abl (Sigma, США), anti-polyHistidine (Sigma, США), anti-GFP (ThermoFisher Scientific, USA), anti-GLG1 антитіла (PA5-32780, ThermoFisher Scientific, США), anti-Golgi Marker (K2217, Santa Cruz Biotechnology, США), anti-phosphotyrosine антитіла (MA1-82787, ThermoFisher Scientific, США), anti-ZNF217 (PA5-28059, ThermoFisher Scientific, США).

*Вторинні антитіла:* anti-mouse (AS003, ABclonal Technology, США), anti-rabbit, DyLight550 (SB245608, ThermoFisher Scientific, США), anti-mouse, DyLight488 (SA234709, ThermoFisher Scientific, США).

## 2.4. Біологічний матеріал

*Клітинні лінії людини.* У роботі використовували іморталізовану лінію людських міелоїдних клітин K562, надані з банку клітин інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Е. Кавецького НАН України. Клітини K562 отримані від хворого на ХМЛ на стадії бластного кризу, їх характерною особливістю є наявність філадельфійської хромосоми (Ph<sup>+</sup>) та додаткової перебудови t(15;17).

Клітини епітелію ембріональної нирки людини 293T отримані з банку клітин відділу молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і



генетики НАН України. Клітини 293Т є похідними клітин НЕК 293, але на відміну від них вони експресують великий Т антиген SV40, що сприяє експресії плазмід, які мають SV40 промотор.

*Клітинні лінії Escherichia coli.* DH5 $\alpha$  (Stratagene, США) та ArcticExpress (DE3) (Agilent Technologies, США).

*Плазмідні вектори.* pUC18 (Addgene, США), pCMV-NA (Clontech, США), pEGFP-C3 (Clontech, США), pEGFP-PH (Miroshnychenko D. et al. 2010), Плазмідні вектори pET-28c-PH та pmCitrineC1-PH люб'язно надані Гур'яновим Д.С. (ІМБГ НАНУ, Україна).

## 2.5. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Полімеразну ланцюгову реакцію здійснили з використанням високо специфічної 1,25 одиниць Pfu DNA полімерази (Fermentas, Литва). До реакційної суміші вносили 5 мкл 10x буферу Pfu +MgSO<sub>4</sub>, 5 мкл 100 mM dNTP (Fermentas, Литва), 2,5 мкл 5mM прямого та зворотнього праймерів та доводили до 50 мкл водою вільною від нуклеаз. В якості матриці використали генетичну конструкцію pCMV-XL5-USP1 з банку плазмід відділу молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Реакцію ПЛР проводили на приладі «5333 MasterCycler Thermal Cycler» (Eppendorf, Німеччина) за умов: ініціація денатурації - +94 °C протягом 3 хв., денатурація - +94 °C, 40 сек, +55°C - 40 сек, +72°C - 1хв. 30 сек (30 циклів). Фінальну елонгацію проводили при +72°C протягом 5 хв.

## 2.6. Електрофорез нуклеїнових кислот у агарозному гелі

Електрофоретичне розділення нуклеїнових кислот проводили за допомогою 1% агарозних гелів у 40 mM трис-ацетатному буфері (40 mM Tris, 20 mM CH<sub>3</sub>COOH, 1 mM EDTA, pH 8,3) за напруги 5В/см. Аналіз розмірів фрагментів ДНК здійснили за допомогою маркера молекулярних мас GeneRuler

1 kb DNA ladder, ready-to-use (ThermoFisher Scientific, США). Для візуалізації результатів гелеву пластинку інкубували з бромистим етидієм аналізували за допомогою транслюмінатора з довжиною хвилі 254 нм.

### **2.7. Виділення фрагментів ДНК з агарозного гелю**

За допомогою методу електрофоретичного розділення нуклеїнових кислот в агарозному гелі визначили розміри і розташування фрагментів ДНК та вирізали з гелю смужку, яка несе бажаний фрагмент. Гель з фрагментом ДНК зважували та розчиняли у 3-кратній за об'ємом кількості адс.буферомі протягом 7-10 хв, ретельно перемішали. Попередньо підготували пробірку для очищення ДНК, в основі якої була 0,5 мл пробірка Епандорф дно якої прокололи голкою від медичного шприца. Мікрофіброве волокно помістили до пробірки та ущільнили. Отриману суспензію перенесли до підготовленої пробірки, яку помітили у чисту 1,5 мл пробірку із зрізаною кришкою та центрифугували протягом 1,5-2 хв. при 10000 об/хв. Отриманий осад промивали буферами та розчинили в потрібному об'ємі дистильованої води.

### **2.8. Фосфорилювання фрагментів ДНК**

До фрагментів ДНК, які були отримані за допомогою ПЛР, вносили 1мкл. 10 мМ АТФ та 0,2 мкл. Т4 полінуклеотид кіназа "Promega" (США), ретельно перемішували та інкубували протягом 30 хв. за температури +37°C. Інактивацію ферменту проводили на водяній бані протягом 15-20 хв. за температури + 75°C.

### **2.9. Реакція рестрикції**

Реакції рестрикції проводили з використанням ендонуклеаз рестрикції та буферів виробництва компанії (Fermentas, Литва) відповідно до рекомендацій

виробника. Реакції рестрикції проводили за температури + 37°C протягом 1,5 год. Ефективність реакції аналізували шляхом електрофорезу нуклеїнових кислот у агарозному гелі. В якості маркера молекулярних мас використали O'GeneRuler plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

### **2.10. Дефосфорилювання**

До реакційної суміші, яка була отримана після реакції рестрикції плазмідних векторів, вносили 1 мкл. FastAP (ThermoFisher Scientific, США) та інкубували протягом 30 хв. за температури +37°C. Інактивацію фермента проводили на водяній бані протягом 15-20 хв. за температури + 75°C.

### **2.11. Плазмідні конструкції**

Моделювання генетичних конструкцій здійснили за допомогою програми Serial Cloner 2.6.1. Кодуючу послідовність гена USP1 ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням праймерів USP1 fwd (AATTGCCTGGTGTACATACCTAGTG) та USP1 rev (GAGAGACCAATAATATCCAGTAGC). Підбір праймерів здійснили за допомогою програми PerlPrimer. Отриману кодуючу послідовність гена USP1 лігували у вектор pUC18 по сайтах SmaI та субклонували у вектори еукаріотичної експресії pCMV-НА та pEGFP-C3 по KpNI і SalI сайтам. Плазмідні вектори pUC18, pCMV-НА та pEGFP-C3 надані у банку плазмід відділу молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ. Відбір та аналіз плазмідних векторів здійснили за допомогою реакції рестрикції та ПЛР. Послідовність конструкцій визначали за допомогою секвенування за методом Сенгера на автоматичному секвенаторі «Applied Biosystems 3130» (США). Отримані результати аналізували відповідно до баз даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації, США (National Center for Biotechnology Information).

## 2.12. Реакція лігування

Реакції лігування здійснили за допомогою T4 DNA лігази (Thermo Fisher Scientific, США) відповідно до умов виробника за температури +16 °C протягом 12 год. Отриману реакційну суміш використали для трансформації компетентних клітин E.coli штаму DH5 $\alpha$  (Stratagene, США).

## 2.13. Отримання компетентних клітин

Культуру клітин E. Coli штам DH5 $\alpha$  (Stratagene, США) чи ArcticExpress (DE3) (Agilent Technologies, США) вирощували у 30-50 мл. середовища LB (1% NaCl, 1% бектотриптон, 0,5% дріжджовий екстракт) з відповідним антибіотиком та культивували протягом 3-5 год. а температури +37°C до досягнення густини OD600 при довжині хвилі 540 нм ( $5 \times 10^7$  клітин/мл). Потім клітини центрифугували 20 хв. при 1500 об./хв. за температури +4°C. Супернатант вилучали, до клітин вносили охолоджений розчин 0,1 М CaCl<sub>2</sub> з 15% гліцерину, обережно ресуспендували та залишали на льодові на 1-2 хв. Клітини центрифугували 20 хв. при 1500 об./хв. Супернатант видаляли, а до осаду внесли 3 мл. охолодженого розчину 0,1 М CaCl<sub>2</sub> з 15% гліцерину та інкубували 20 хв. на льодові. Клітини розфасовували по мікропробірках і зберігали при -80°C. Всі вище зазначені операції виконували на льодові.

## 2.14. Трансформація

Розчин плазмідної ДНК чи лігазної суміші об'ємом не більше 5% від загального об'єму аліквоти вносили до компетентних клітин, які попередньо тримали на льодові 10 хв. Отриману суспензію ретельно перемішували та інкубували на льодові протягом 30 хв. Тепловий шок проводили на водяній бані з температурою +42°C протягом 90 с. До реакційної суміші додавали поживне середовище LB (1% NaCl; 1% бектотриптон; 0,5% 58 дріжджовий екстракт) без

антибіотика та інкубували протягом 40 хв. у термостаті за температури +37°C та постійному перемішуванні 120 об/хв. Культуру відбирали шляхом центрифугування за умови 7000-10000 об/хв протягом 2 хв. та висівали її на стерильну чашку Петрі з твердим поживним середовищем (LB + 1,5 % бактоагар+антибіотик) за допомогою бактеріального шпателя. Чашки Петрі з культурою інкубували у термостаті протягом 10-12 год за температури +37°C після чого аналізували колонії, що вирости.

## 2.15. Виділення плазмід

Одиничну колонію бактеріальних клітин *E. coli* штам DH5 $\alpha$  (Stratagene, США) вирощували у поживному середовищі LB + відповідний антибіотик за температури +37°C протягом 10-12 годин. Культуру клітин центрифугували протягом 2-3 хв. при 10000 об/хв. Надосад видаляли, а до осаду, який становили бактеріальні клітини додавали 500 мкл. неіонного детергенту (ND), ретельно перемішували за допомогою вортекс та залишали на 5 хв. на водяній бані з температурою +65°C. Отриману суспензію центрифугували протягом 40 хв. при 12000 об/хв. Осад видаляли, а до отриманої суспензії додавали ізопропанол, в об'ємі 1:1 (1:1, об'єм реакційної суміші:ізопропанол) та центрифугували протягом 20-30 хв. при 10000-12000 об/хв. Супернатант видаляли та промивали за допомогою 500 мкл 70% етанолу. Після видалення етанолу осад сушили при кімнатній температурі та розчиняли в потрібному об'ємі дистильованої води.

## 1.16. Очищення плазмідних векторів від молекул РНК

До плазмідних векторів очищених за допомогою неіонного детергента (ND) додавали 0,75 М LiCl, 5% тритону X-114, 1% хлороформу, ретельно перемішали та інкубували на водяній бані на 5 хв. за температури +70°C. Реакційну суміш центрифугували протягом 5 хв. при 5000 об./хв., верхню фракцію відібрали у нову пробірку та додали до неї 5% тритону X-114, 1%

хлороформу, ретельно перемішували та центрифугували 5 хв. при 5000 об./хв. Верхню фракцію відібрали у нову пробірку та додали 1% хлороформу, ретельно перемішували, та центрифугували 5 хв. при 5000 об./хв. Дану операцію повтори два рази. Верхню фракцію відібрали у нову пробірку та додали ізопропанол (1:1, об'єм реакційної суміші:ізопопанол), ретельно перемішували та центрифугували 20-30 хв. при 12000 об./хв. Ізопропанол видаляли та додали 500 мкл. 70% етанолу центрифугували протягом 15-20 хв. при 12000 об./хв., після цього етанол видаляли. Осад сушили при кімнатній температурі та розчиняли в потрібному об'ємі дистильованої води.

### **2.17. Експресія рекомбінантних білків**

Для експресії рекомбінантних білків у бактеріальній системі використовували плазмідний вектор рЕТ-28с-РН та плазмідні вектори рСМV-НА-USP1, рЕСFP-C3-USP1 для клітин ссавців. Експресію рЕТ-28с-РН здійснили у клітинах *E. coli* штам ArcticExpress - DE3 (Agilent Technologies, США). Бактеріальну культуру вирощували у середовищі LB (1% NaCl; 1% бактотриптон; 0,5% 58 дріжджовий екстракт) з використанням селективних антибіотиків при температурі +16°C за умов постійного перемішування 120 об/хв. Експресію цільового білка індукували 1 мМ IPTG до фінальної концентрації протягом 3-4 год.

### **2.18. Очищення рекомбінантних білків за допомогою афінної хроматографії**

Хроматографічну колонку з Ni<sup>+</sup>-NTA агарозою (Sigma, США) урівноважили буфером для промивання (50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 мМ NaCl, рН 8,0) та внесли лізати бактеріальних клітин, які експресували РН домен з His-тагом. Колонку промивали буфером (50мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300мМ NaCl, 20мМ імідазолу, рН 8,0). та вносили лізати клітин K562. Після інкубації з лізатами

K562, яка тривала 10-12 год. за температури +4°C, колонку промивали елюційним буфером (50мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300мМ NaCl, 250мМ імідазолу). До зразків додавали буфер для нанесення з b-MeEtOH (200мМ Tris-HCl, pH 6,8, 400мМ b-MeEtOH, 4% SDS, 0,01% бромфеноловий синій, 40% гліцерину) та інкубували протягом 5 хв. на водяній бані при температурі +99 °C / +100 °C. Отримані зразки аналізували методом Western-блот.

### 2.19. Культивування клітин ссавців

Клітини K562 вирощували у середовищі RPMI 1640 (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби (Sigma, США) пеніциліну (50 од/мл) та стрептоміцину (100 мкг/мл). Клітини 293Т вирощували в середовищі Ігла, модифікованому Дюльбекко DMEM (ThermoFisher Scientific, США), з додаванням 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби (FBS), пеніциліну (50 од/мл) та стрептоміцину (100 мкг/мл). Культивування K562 і 293Т клітин проводили в зволоженій атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> при температурі +37°C. При досягненні клітинами 70-80% конфлюентності їх пересівали у розведенні 1/10. Для цього клітини K562 відбирали у стерильну пробірку типу епандорф та центрифугували 1-2 хв. при 1000 об/хв. Надосад видаляли, а осад, який становили клітини K562 ресуспендували з поживним середовищем RPMI 1640, яке містило всі необхідні речовини та переносили у новий стерильний культуральний посуд. Пересів 293Т клітин, передбачає їх відкріплення від поверхні чашки Петрі, для цього ми відбирали поживне середовище та промивали клітини попередньо нагрітим до +37°C розчином PBS. Відкріплення 293Т клітин шляхом інкубації з 0,25% трипсину з 0,02% мМ ЕДТА протягом 1-3 хв. Клітини ресуспендували з поживним середовищем DMEM, яке містило всі необхідні компоненти та переносили в новий стерильні чашки Петрі.

## 2.20. Трансфекція клітин еукаріотичної лінії 293Т

*Аналіз локалізації білків у клітинах 293Т.* Трансфекцію клітин 293Т здійснили за допомогою поліетиленіміну (ПЕІ) (Sigma, США). Для визначення локалізації білка USP1 ми використали 3 мкг рЕСFP-C3-USP1, для встановлення локалізації РН-домену – 3 мкг рmCitrineC1-РН із банку плазмід відділу молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. В якості контролю використовували плазмідні вектори рЕСFP-C3 та рmCitrineC1 у кількості 3 мкг кожен. Плазмідну ДНК розчиняли у 200 мкл DMEM та вносили відповідний об'єм ПЕІ (3: 1, мкл. ПЕІ : мкг. ДНК), ретельно перемішували. Реакційну суміш залишали при кімнатній температурі на 20-30 хв., після цього додавали до клітин 293Т у 6-лунковому планшеті, які мали 70-80% конфлюентності. Клітини вирощували з поживному середовищі DMEM з додаванням 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби (Sigma, США) пеніциліну (50 од/мл) та стрептоміцину (0,25 мкг/мл) протягом 24 год. при +37° С та 5% CO<sub>2</sub>. Локалізацію білків аналізували за допомогою флуоресцентної та конфокальної мікроскопії.

*Трансфекція рCMV-USP1 і рmCitrineC1-РН у клітні 293Т.* Для трансфекції використали 9 мкг. рCMV-НА-USP1 і 9 мкг. рmCitrineC1-РН, в якості контролю – 9 мкг. рCMV-НА. Плазмідну ДНК розчиняли у 200 мкл DMEM та додали відповідний об'єм ПЕІ (3: 1, мкл. ПЕІ : мкг. ДНК). Реакційну суміш залишали при кімнатній температурі на 20-30 хв., після цього вносили до чашки Петрі із клітинами 293Т, які досягли 70-80% конфлюентності. Клітини вирощували з поживному середовищі DMEM з додаванням 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби (Sigma, США) пеніциліну (50 од/мл) та стрептоміцину (0,25 мкг/мл) протягом 24 год. при +37° С та 5% CO<sub>2</sub>.

## 2.21. Приготування лізатів клітин ссавців

Клітини K562 відбирати у стерильну пробірку типу епандорф та центрифугували 1-2 хв. при 1000 об/хв. Надосад видаляли, а осад промивали PBS



шляхом центрифугування протягом 2 хв. при 1000-2000об/хв за температури +4°C. До осаду клітин додали лізис буфер NP40 (150 мМ NaCl, 1,0% тритон X100, 50 мМ трис-HCl pH 8,0, 1 мМ PMSF, 2 мМ NaVO<sub>3</sub>) та інкубували протягом 15-20 хв. на льодові. Клітини 293Т промоли PBS та інкубували лізис буфером NP40 (150 мМ NaCl, 1,0% тритон X100, 50 мМ трис-HCl pH 8,0, 1 мМ PMSF, 2 мМ NaVO<sub>3</sub>) протягом 15-20 хв. Всі операції проводили на льоду. Після цього клітини K562 та 293Т центрифугували 15 хв. при 12000-13000 об/хв. за температури +4°C. Надосад відбирали у чисту охолоджену пробірку, осад видаляли. До суспензії клітин K562 та 293Т додавали буфер для нанесення з b-MeEtOH (200mMTris-HCl, pH 6,8, 400mM b-MeEtOH, 4% SDS, 0,01% бромфеноловий синій, 40% гліцерину) та інкубували протягом 5 хв. на водяній бані при температурі +99 °C / +100 °C. Зразки зберігали при -20 °C.

## **2.22. Коімунопреципітація білкових комплексів**

Попередньо врівноважену сефарозу G (Sigma, США) лізис буфером NP40 (150 мМ NaCl, 1,0% тритон X100, 50 мМ трис-HCl pH 8,0) протягом 2,5-3 год. інкубували з 2-3 мкл. відповідних антитіл: anti-Bcr (G2117, Santa Cruz Biotechnology, США), anti-Abl (Sigma, США), anti-polyHistidine (Sigma, США), anti-phosphotyrosine антитіла (MA1-82787, ThermoFisher Scientific, США). Після цього до реакційної суміші вносили лізати клітин K562/293Т та інкубували протягом 2,5-3год. У контрольному варіанті сефарозу G інкубували з лізатами клітин без антитіл. Зразок промивали з буфером NP40 (150 мМ NaCl, 1,0% тритон X100, 50 мМ трис-HCl pH 8,0, 1 мМ PMSF, 2 мМ NaVO<sub>3</sub>) шляхом центрифугування протягом 1,5 хв. при 3000 об./хв. Всі зазначені операції здійснювалися при температурі +4°C. До зразків додавали буфер для нанесення з b-MeEtOH (200mMTris-HCl, pH 6,8, 400mM b-MeEtOH, 4% SDS, 0,01% бромфенолового синього, 40% гліцерину) та інкубували протягом 5 хв. на водяній бані при температурі +99 °C / +100 °C.

### 2.23. Культивування клітин K562 з ML323

В експерименті використовували високоспецифічний інгібітор ML323 (Axon medchem, Нідерланди). 52 нМ та 76 нМ інгібітора ML323 вносили до клітин K562 та культивували протягом 24 годин у поживному середовищі RPMI з додаванням всіх необхідних речовин при температурі +37 ° С, вологості 95% і 5% CO<sub>2</sub>. Клітини K562 відбирали через 1,5 год., 3 год., 6 год., 12 год. та 24 год. після внесення інгібітора та вивчали за допомогою вестерн блот, імунофлуоресцентного аналізу, конфокальної мікроскопії.

### 2.24. Електрофоретичне розділення білків у поліакриламідному гелі

Електрофоретичне розділення білків у денатуруючих умовах проводили за стандартною методикою за допомогою камер для вертикального електрофорезу (BioRad, США). Розділення білків проводили у 5% концентруючому та 8-12% розділяючих гелях при співвідношенні акриламід у біс-акриламід у 29:1. Компоненти концентруючого та розділяючого гелів представлені у таблиці 2.1. Після змішування компонентів гелю, розчин швидко завантажували до електрофоретичних касет та чекали поки гель не полімеризується. Розділяючий гель полімеризувався під шаром етилового спирту, який в подальшому видаляли. Лунки у концентруючому гелі створювали за допомогою гребінки наданої виробником камери вертикального електрофорезу. Для детекції розміру досліджуваних білків в одну із лунок вносили маркер молекулярних мас “PageRuler Plus Prestained Protein Ladder” (ThermoFischer Scientific, США).

Електрофорез проводили у тріс-гліциновому буфері (25 мМ тріс, рН 8,3, 192 мМ гліцин, 0,1% ДСН) за напруги 120 В під час проходження зразків через концентруючий гель та 150-170 під час руху зразків у розділяючому гелі. Після

закінчення електрофорезу білки візуалізували за допомогою Вестерн-блот аналізу.

Таблиця 2.1.

**Композиція верхнього концентруючого та нижнього розділяючого гелів**

Компоненти	Кількість (мл.)			
	5%	8%	10%	12%
H <sub>2</sub> O	1,4	4,6	4,0	3,3
30% розчин акриламід	0,33	2,7	3,3	4,0
1 М тріс, рН 6,8/8,8	0,25	2,5	2,5	2,5
10% розчин SDS	0,02	0,1	0,1	0,1
10% розчин персульфату амонію	0,02	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,002	0,006	0,004	0,004

### 2.25. Вестерн-блот аналіз

Після електрофоретичного розділення у поліакриламідному гелі білки переносили на нітроцелюлозну мембрану у буфері для переносу (192 мМ гліцин, 25 мМ Tris-HCl, 20% метанол) протягом 1,5 год. при 250 мА за допомогою апарату для електропереносу (BioRad, США). Щоб запобігти неспецифічному зв'язуванню антитіл, нітроцелюлозну мембрану блокували розчином ВСА протягом ночі при +4°C. Потім мембрану інкубували з відповідними первинними антитілами протягом 1 год. Від первинних антитіл відмивали за допомогою TBST (50 мМ Tris рН 7,5, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween 20), три рази по 5 хв. та інкубували в розчині вторинних антитіл. Після промивки від вторинних антитіл, мембрану проявляли за допомогою хемолюмінесцентної детекції на приладі Molecular Imager ChemiDoc XRS+ (BioRad, США). Перед проявкою мембрану змочували у ECL буфері, який

отримували шляхом змішування у рівних об'ємах буферу А (100 мМ Tris-HCl, рН8.5, 2,5 мМ люмінал, 0.4 мМ кумарова кислота) та буферу Б (100 мМ Tris-HCl, рН8,5, 0.023% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) перед використанням. Інтенсивність отриманих сигналів аналізували за допомогою програмного забезпечення ImageLab.

### **2.26. Біоінформатичне передбачення сайтів фосфорилювання**

Передбачення сайтів фосфорилювання здійснили за допомогою веб-серверів «Disphos1.3», «KinasePhos», «NetPhos2.0 Server» та «PhosphoPICK». Послідовності білків для передбачення були отримані з баз даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації, США (National Center for Biotechnology Information).

### **2.27. Культивуація клітин K562 з іматинібом**

До клітин K562 вносили 2,5 мМ іматинібум та культивували протягом 24 годин у поживному середовищі RPMI з додаванням всіх необхідних речовин при температурі +37 °С, вологості 95% і 5% CO<sub>2</sub>. Клітини K562 аналізували після 24 год. інкубації з іматинібом за допомогою імунофлюоресцентного аналізу та конфокальної мікроскопії.

### **2.28. Імунофлюоресцентний аналіз**

Клітини K562 відбирали шляхом центрифугування 1,5-2 хв. при 2000 об./хв. Надосад видаляли, а клітини промивали буфером PBS (140 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) та фіксували за допомогою 4% розчину формальдегіду з 0,2% Triton X-100 в буфері при кімнатній температурі протягом 15-20 хв. Від залишків формальдегіду клітини три рази відмивали PBS шляхом центрифугування протягом 1,5-2 хв. при 2000 об./хв. та протягом 1 год. блокували клітини від неспецифічного зв'язування антитіл за допомогою

розчину BSA. Після цього клітини протягом 1 год. по чергово інкубували з відповідними первинними та вторинними антитілами у визначеному виробником розведенні та промивали три рази буфером PBS шляхом центрифугування 1,5-2 хв. при 2000 об./хв. Ядра клітин фарбували за допомогою DAPI (ThermoFisher Scientific, США) протягом 2 хв. Препарат на скельцях полімеризували з використанням CitiFluor™ AF1, Mounting Medium (Science Services, Німеччина). Мікропрепарати вивчали за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопу Zeiss LSM 510 Meta (Німеччина), з масляним об'єктивом 100x1.25 N.A та програмою «LSM Browser».

### **2.29. Кількісний аналіз колокалізації білків**

Аналіз колокалізації білків здійснили за допомогою програмного забезпечення Fiji ImageJ, плагіна JACoP з урахуванням коефіцієнта кореляції Пірсона (PCC) та коефіцієнта колокалізації Мандерса (MCC).

### **2.30. Статистична обробка результатів**

Статистичну обробку результатів здійснили за допомогою програм Excel (MS Office 2010). Порівняння двох нормально розподілених груп проводили за допомогою t-тесту Стьюдента. Результати експериментів представлені у вигляді середнього арифметичного значення із зображенням стандартного відхилення ( $\pm SD$ ).

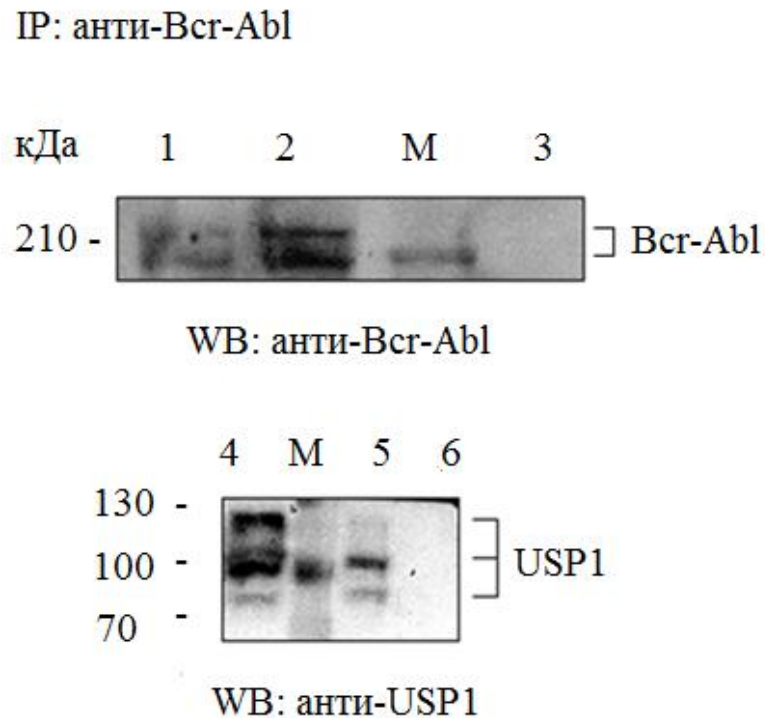
## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 3.1. Ідентифікація та характеристика білкового комплексу Bcr-Abl/USP1 у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії людини

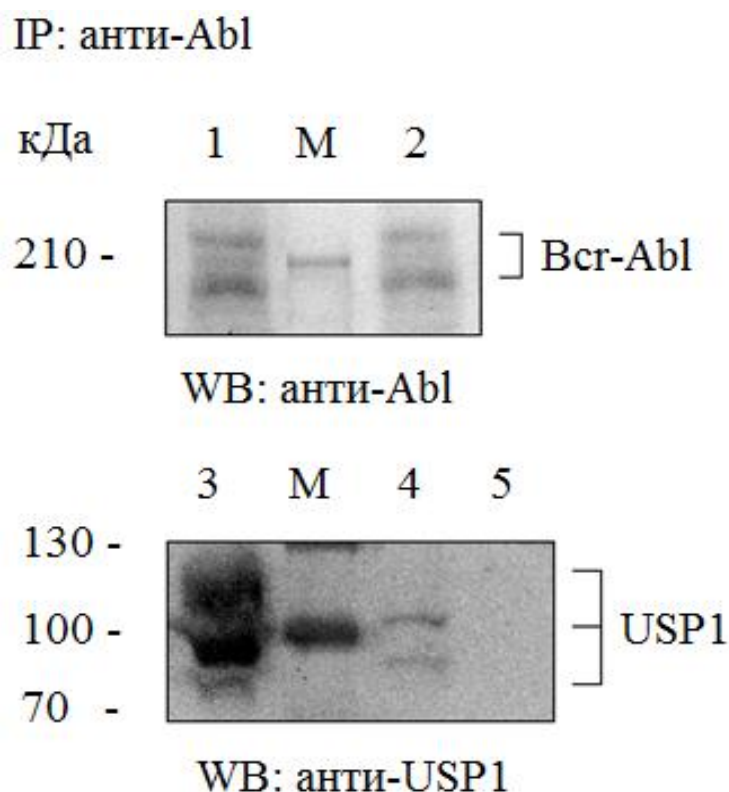
**3.1.2. Взаємодії онкобілка Bcr-Abl і білка USP1.** Одним із завдань дисертаційної роботи було виявлення нових білкових партнерів кінази Bcr-Abl. За попередньо отриманими результатами мас спектрометричного аналізу проведеного у відділі молекулярної генетики ІМБГ НАН України, білок USP1 був визначений як потенційний кандидат на взаємодію з онкобілком Bcr-Abl [17]. Для експериментального підтвердження взаємодії онкобілка Bcr-Abl з деубіквітиназою USP1 ми використали метод ко-імунопреципітації білкових комплексів, який є одним із потужних сучасних методів для виявлення нових білків-партнерів. Для дослідження було обрано іморталізовану клітинну лінію K562, отриману від хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію на стадії бластного кризу, з конститутивною експресією онкобілка Bcr-Abl. У першому варіанті дослідження, імунопреципітацію ендогенного білка USP1 здійснили з використанням антитіл проти Bcr-Abl. У другому варіанті використали антитіла проти Abl. Білки, які зв'язалися з даним антитілами розділили у поліакриладідному гелі. Візуалізацію результатів здійснили за допомогою методу вестерн блот. Аналіз блотограми з результатами ко-імунопреципітації підтвердив взаємодію кінази Bcr-Abl з білком USP1. Позитивний результат був підтверджений як для першого варіанту дослідження, з використанням антитіл проти Bcr-Abl (рис. 3.1.) та і для другого – з використанням антитіл проти Abl (рис. 3.2.). Слід зазначити, що білок USP1 характеризується наявністю трьох ізоформ, які мають тканино-специфічний прояв [103,136]. Найбільші розміри має ізоформа 1. Ізоформи 2 і 3 мають альтернативні сайти початку транскрипції та містять альтернативний екзон у 5' UTR у порівнянні з ізоформою 1.

Експериментальним чином ми з'ясували, що для клітин K562 характерна наявність всіх трьох ізоформ білка USP1, в той час як із онкобілком Vcr-Abl взаємодіють лише дві із них.



**Рис. 3.1.** Преципітація ендогенних білків з лізату клітин K562, за допомогою антитіл проти Vcr-Abl: 1 – онкобілок Vcr-Abl, лізати клітин K562 (контроль); 2 – онкобілок Vcr-Abl, результати коімунопреципітації; 3, 6 – інкубація агарози лише з лізатами клітин K562 (контроль); 4 – білок USP1, лізати клітин K562 (контроль); 5 – білок USP1, результати коімунопреципітації; M – маркер молекулярних мас Plus Prestained 10 250kDa Protein Ladder (Thermo Scientific). IP – імунопреципітація, WB – вестерн блот

Дана закономірність була присутня у обох варіантах експерименту з використанням антитіл проти різних частин гібридного онкобілка, що підтверджує достовірність проведеного дослідження та виключає можливість отримання результатів, за рахунок утворення білкового комплексу з нормальним білком Vcr, а не власне з онкобілком Vcr-Abl.



**Рис. 3.2.** Преципітація ендогенних білків з лізату клітин K562, за допомогою антитіл проти Abl: 1 – онкобілок Vcr-Abl, лізати клітин K562 (контроль); 2 – онкобілок Vcr-Abl, результати коімунопреципітації; 3 – білок USP1, лізати клітин K562 (контроль); 4 – білок USP1, результати коімунопреципітації; 5 – інкубація агарози лише з лізатами клітин K562 (контроль); M – маркер молекулярних мас Plus Prestained 10 250kDa Protein Ladder (Thermo Scientific). IP – імунопреципітація, WB – вестерн блот

Таким чином, ми отримали експериментальне підтвердження прямої взаємодії онкобілка Vcr-Abl з двома ізоформами деубіквітинирази USP1 у клітинах K562. Представлені результати сприяють більш глибокому розумінню сигнальних шляхів, які можуть бути трансформовані за участі кінази Vcr-Abl та визначають білок USP1 перспективною мішенню для подальшого вивчення у контексті патогенез хронічної мієлоїдної лейкемії.



### **3.1.2. Колокалізації онкобілка Vcr-Abl і білка USP1 у клітинах K562**

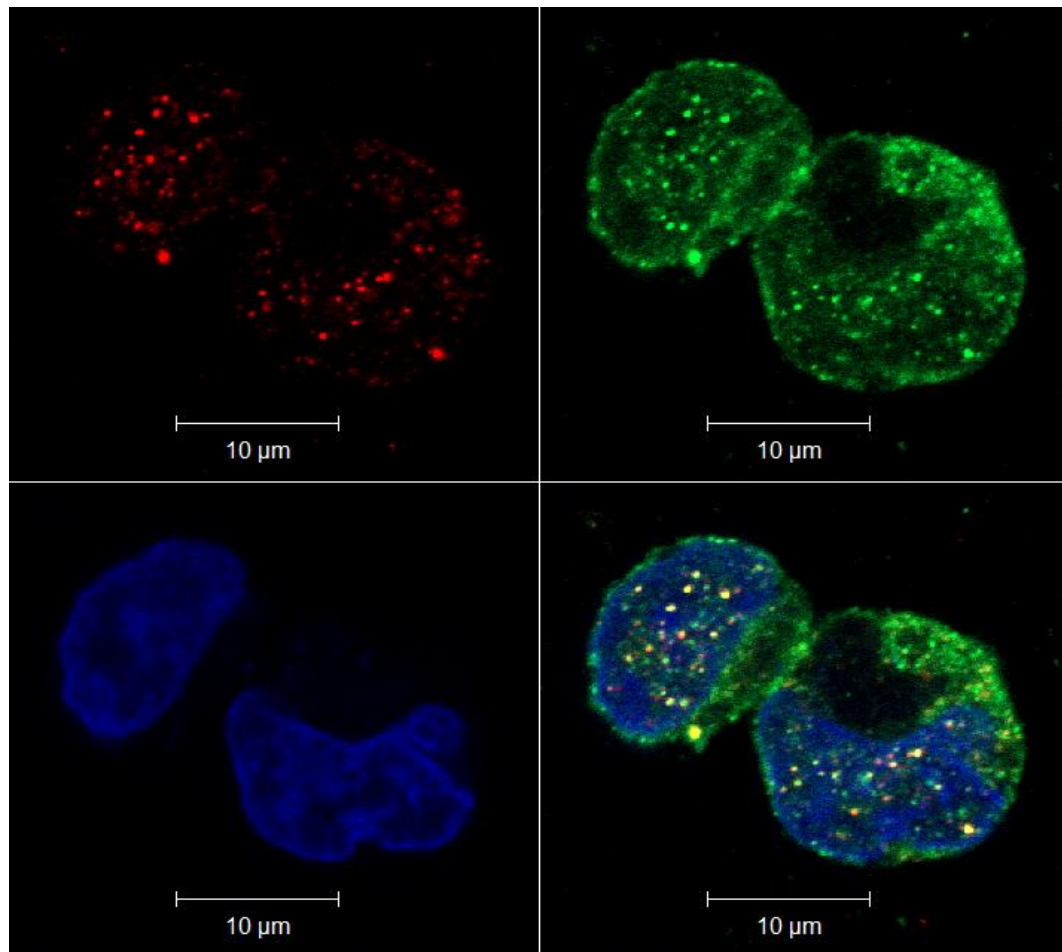
**3.3.2.1. Адаптація імунофлуоресцентного методу для роботи із суспензійною культурою K562.** Для визначення локалізації білків у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії ми адаптували метод імунофлуоресцентного аналізу, оскільки робота за стандартними протоколами була ускладнена суспензійним типом культури K562 та технічними можливостями лабораторії.

Основною перешкодою при роботі з суспензійними клітинами є їх слабка адгезивна здатність, тому для подолання цієї проблеми рекомендується використовувати сполуки, які сприяють прикріпленню клітин до робочої поверхні. Серед таких препаратів відомі сполуки як біологічного походження (колаген, ламінін та фібронектин) так і синтетичного (полі-D-лізин (PDL) та полі-орнітин) тощо [193]. Деякі протоколи розроблені з використанням механічних способів, що сприяють адгезії клітин [194]. Проте отримане таким чином прикріплення клітин K562 до пластикової чи скляної поверхні було досить не стійке і супроводжувалося їх значною втратою в ході проведення імунофлуоресцентного аналізу, що вимагає постійної зміни інкубаційних середовищ, зокрема включаючи фіксацію, пермеабілізацію, первинну та вторинну інкубацію антитіл та безліч етапів промивання між ними [193]. Деякі автори рекомендують здійснювати прикріплення клітин після етапу блокування, перед самою інкубацією з антитілами, проте це є досить складним процесом, оскільки під час фіксації клітини втрачають пружність та еластичність, стають більш жорсткі [195].

Тому, для реалізації поставленої мети дослідження ми адаптували імунофлуоресцентний метод для роботи із суспензійними клітин K562. Особливістю нашого підходу є те, що ми повністю відмовляємося від необхідності прикріплення клітин, всі етапи, зокрема і інкубація з антитілами проводяться у пробірці у розчині. Для уникнення скупчення клітин на дні, об'єм пробірки періодично обережно перемішувався. Відбір клітин здійснили за допомогою центрифугування, надосад видалявся, а до осаду вносився необхідний розчин. Нами визначено, під час відбору клітин K562, оптимальні

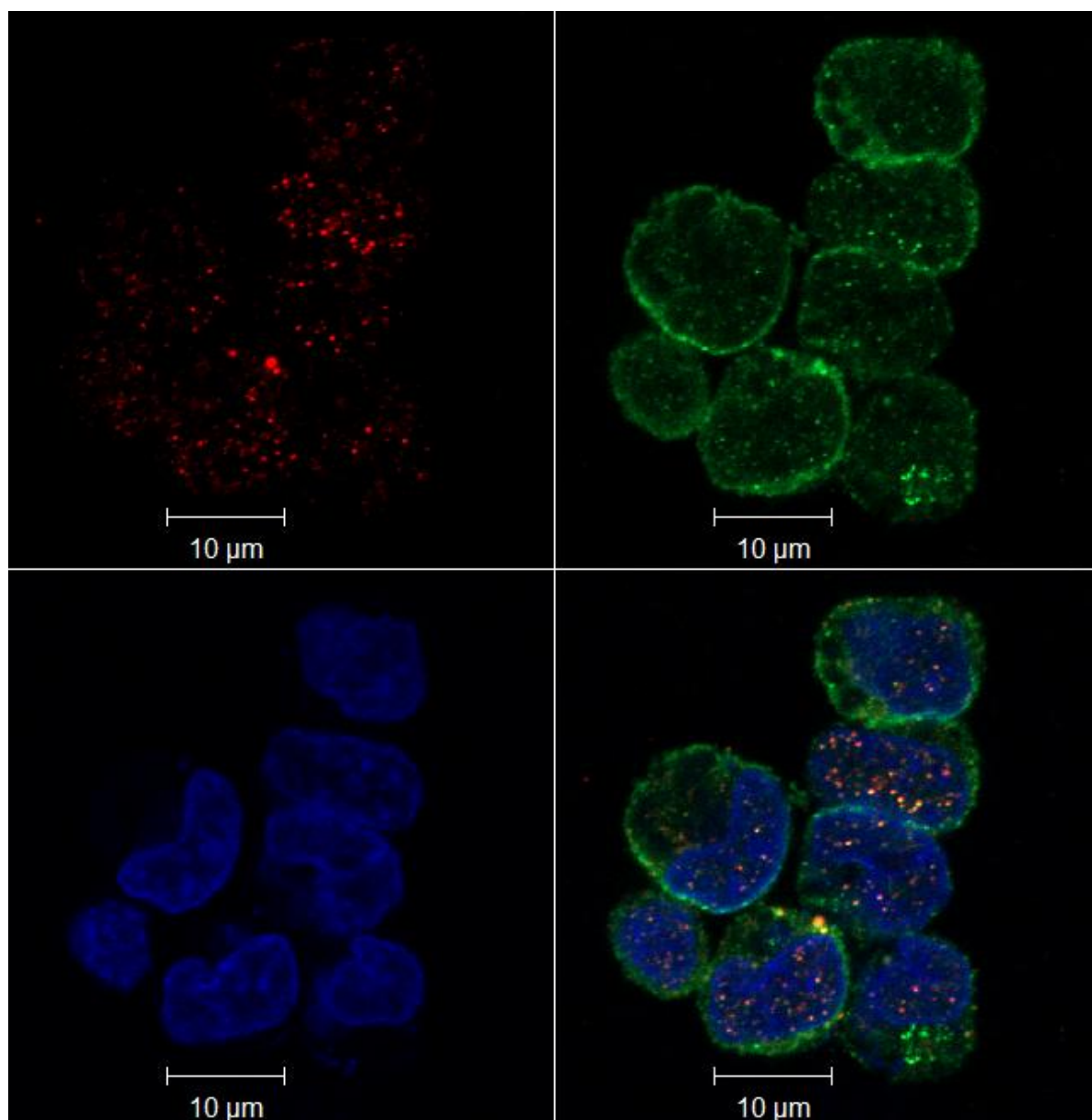
умови центрифугування складають 2 хв. при 2 000 об/хв. Запропонована адаптація імунофлуоресцентного методу була апробована у відділі молекулярної генетики ІМБГ НАН України. Аналіз клітин за допомогою флуоресцентної і конфокальної мікроскопії підтвердив дієвість та ефективність запропонованої адаптації методу. При цьому втрати клітин від час виконання методики були мінімальні, а об'єм використання антитіл можна звести до мінімуму. Крім того, запропонована модифікація, не потребує використання додаткових реагентів та обладнання. Всі подальші результати дисертаційної роботи з визначення локалізації та колокалізації нативних білків у клітинах K562 були отримані завдяки представленій адаптації методу імунофлуоресцентного аналізу.

**3.3.2.2. Колокалізація білків Vcr-Abl і USP1.** Функціональні особливості білків безпосередньо пов'язані з їх субклітинною локалізацією. Для білків, які утворюють білкові комплекси характерною є їх спільна локалізація у компартментах клітини. Аналіз колокалізації білків Vcr-Abl і USP1 білків у клітинах K562 здійснили за допомогою імунофлуоресцентного аналізу з використанням антитіл проти USP1 та антитіл проти Vcr-Abl, у першому варіанті та антитіл проти Abl – у другому. Ядра клітин фарбували ДНК-зв'язувальним барвником DAPI. Білок USP1 належить до ядерних білків, це відомо з літератури та експериментально підтверджено у наших дослідженнях (рис. 3.3б, рис. 3.4б). Аналіз зображень, отриманих за допомогою конфокальної мікроскопії, вивчали за допомогою програмного забезпечення Zeiss LSM Image Browser. Таким чином, встановлено перекриття сигналів локалізації (“точка злиття”) онкобілка Vcr-Abl та білка USP1 у клітинах K562, що візуально проявляється появою жовтого кольору та є прямим підтвердженням колокалізації білків. Як і очікувалося, місцем колокалізації білків Vcr-Abl/USP1 є ядро клітини. Позитивний результат спільної локалізації білків був зафіксований у першому (з використанням антитіла проти Vcr-Abl) (рис. 3.2.) і другому (з використанням антитіла проти Abl) (рис. 3.3) варіанті дослідження.



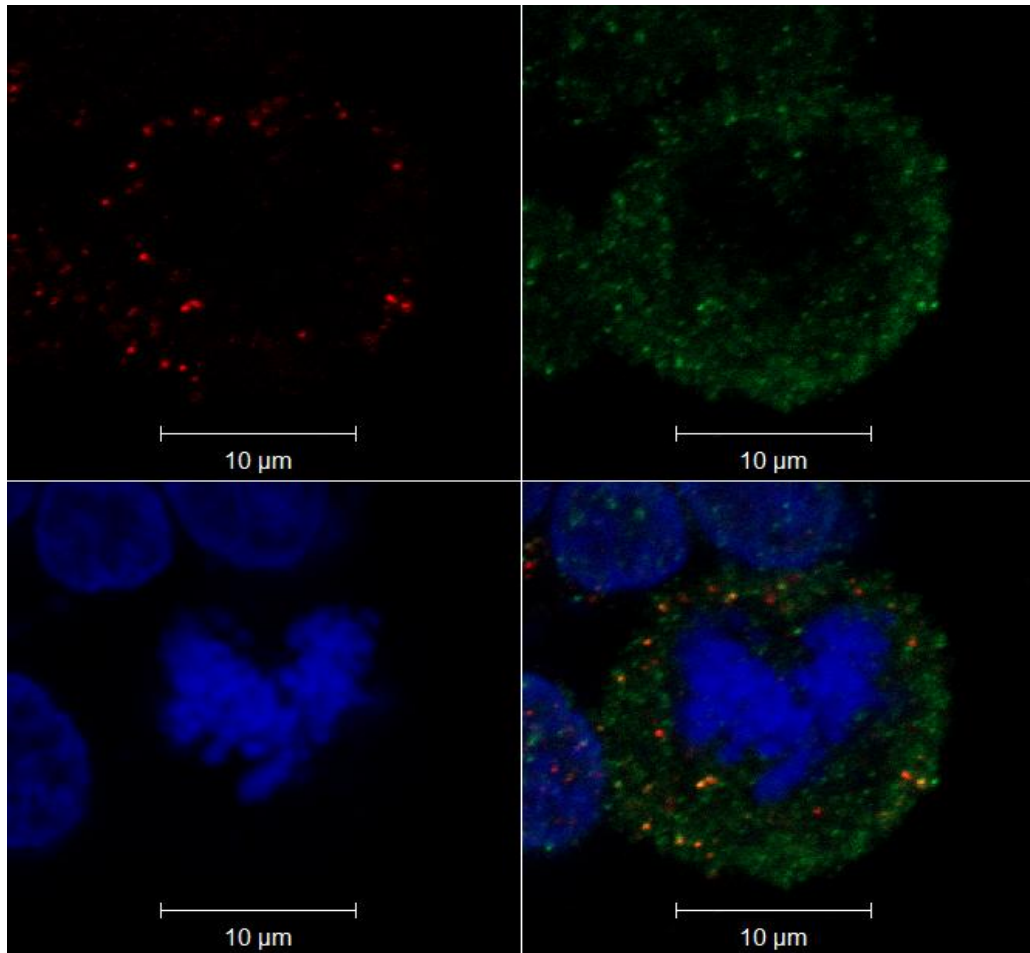
**Рис. 3.3.** Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної локалізації білка USP1 (червоне) і онкобілка Bcr-Abl (зелене) у клітинах K562. Ядра дофарбовані барвником DAPI (синє). Перекриття сигналів локалізації білків Bcr-Abl і USP1 (жовте)

Показано, що білок USP1, активно експресується у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії людини не лише в період інтерфази, а під час мітозу клітин (рис. 3.5а) хоча згідно літературних даних, в нормі експресія USP1 коливаються залежно від клітинного циклу. З'ясовано, що колокалізація онкобілка Bcr-Abl і білка USP1 характерна і для періоду поділу клітин (рис. 3.5в), а отже перебудови сигнальних каскадів під час переходу клітини з інтерфази до мітозу і навпаки, є не критичними для утворення білкового комплексу Bcr-Abl/USP1.



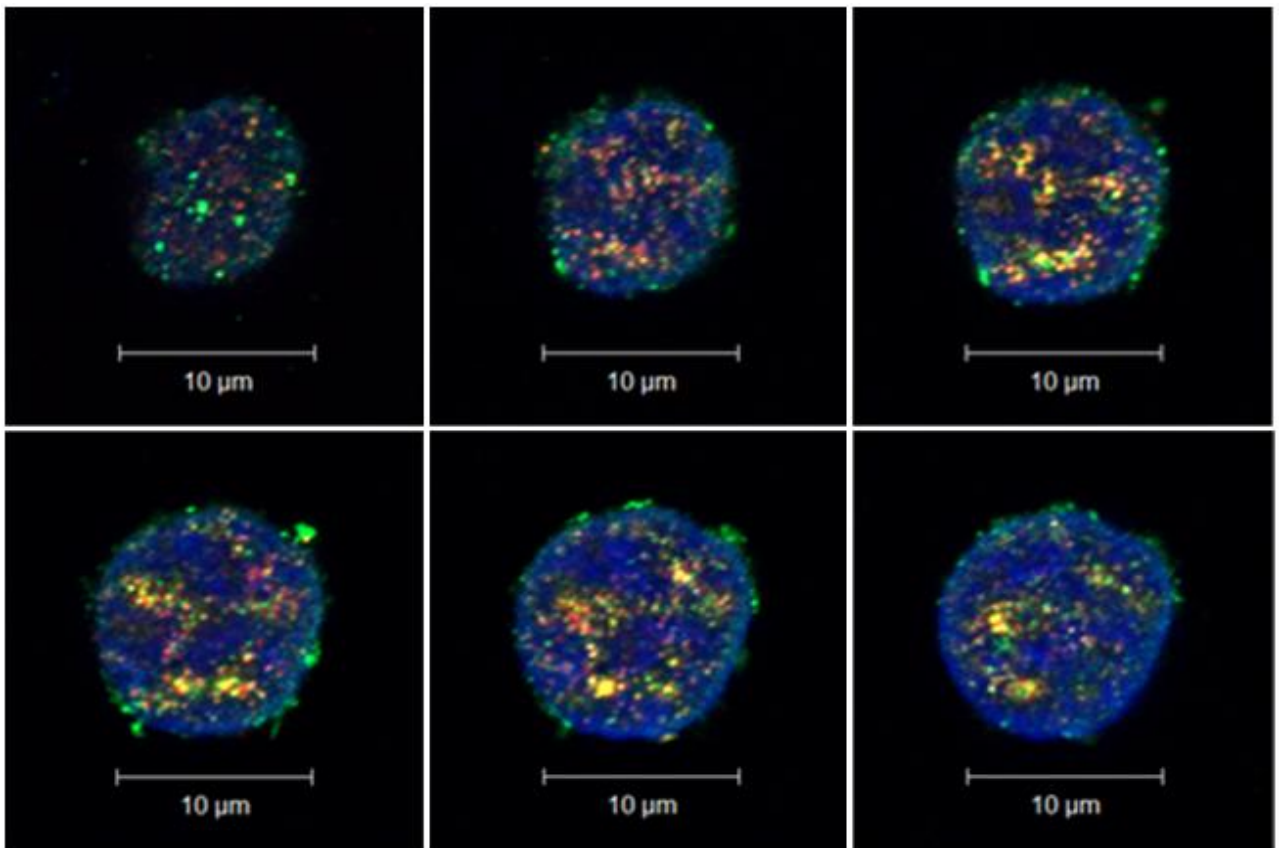
**Рис. 3.4.** Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної локалізації білка USP1 (червоне) і онкобілка Bcr-Abl (зелене) у клітинах K562. Ядра дофарбовані барвником DAPI (синє). Перекриття сигналів локалізації білків Bcr-Abl і USP1 (жовте)

Для достовірності результатів, отримані зображення ми аналізували згідно кількісних показників коефіцієнта кореляції Пірсона (PCC) та коефіцієнтів колокалізації Мандерса (MCC), які є двома основними показниками при біологічних та медичних дослідженнях [196,197].



**Рис. 3.5.** Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної локалізації білка USP1 (червоне) і онкобілка Vcr-Abl (зелене) у клітинах K562. Ядра дофарбовані барвником DAPI (синє). Перекриття сигналів локалізації білків Vcr-Abl і USP1 (жовте)

Коефіцієнт кореляції Пірсона (PCC) відображає лінійну кореляцію зразків та вимірюється у діапазоні від -1 до 1, де 1 – це лінійно пов'язані сигнали локалізації, 0 – часткова кореляція сигналів та -1 – абсолютна різниця локалізації [196]. У наших дослідженнях коефіцієнт кореляції Пірсона для онкобілка Vcr-Abl та білка USP1 у клітинах K562 становить –0,63 для зразків з використанням anti-Vcr-Abl антитіл (рис. 3.6.) та 0,51 для зразків з використанням anti-Abl антитіл (рис. 3.7.), що свідчить про високий рівень кореляції досліджуваних об'єктів.

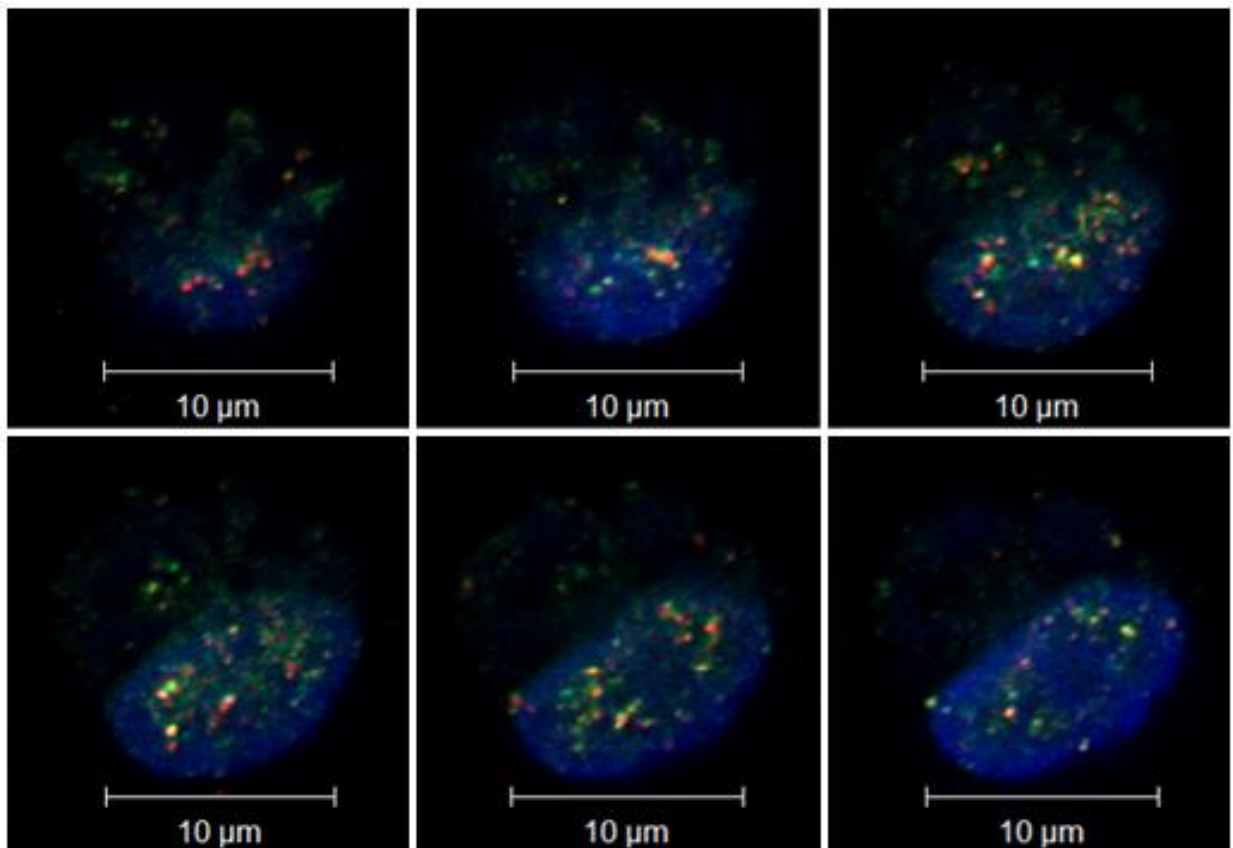


**Рис. 3.6.** Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної локалізації білка USP1 (червоне) і онкобілка Vcr-Abl (зелене) у клітинах K562, z – стекінг зображення. Ядра дофарбовані барвником DAPI (синє). Перекриття сигналів локалізації білків Vcr-Abl і USP1 (жовте)

Виходячи з того, що спільна локалізація білків не обов'язково характеризується пропорційним розподілом, у своїй роботі використали і коефіцієнт колокалізації Мандерса (MCC), який є більш прийнятним для біологічних об'єктів, які погано підходять до простої лінійної моделі, що лежить в основі PCC. MCC вимірюється у діапазоні від 0 до 1, де 1 - повне перекриття сигналів локалізації, 0 - відсутність колокалізації. MCC визначає два компоненти: A – сигнал локалізації першого білка та B – сигнал локалізації другого білка [196]. За допомогою цього можна визначити який відсоток сигналу A перекривається з сигналом B (M1), і навпаки (M2), що особливо важливо, якщо досліджувані зонди характеризуються локалізацією у різних



компартаментах. У нашому випадку індекс M1 відображає частку USP1, що перекривається із Vcr-Abl, а індекс M2, навпаки показує, наскільки частка Vcr-Abl перекривається з USP1. Встановлено, що показник коефіцієнт колокалізації Мандерса M1 у першому варіанті дослідження (з використанням антитіл проти Vcr-Abl) становить 0,9, а у другому варіанті (з використанням антитіл проти Abl) - 0,85. Показники M2 у першому варіанті дослідження склали – 0,58 та 0,53 у другому варіанті.



**Рис. 3.7.** Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної локалізації білка USP1 (червоне) і онкобілка Vcr-Abl (зелене) у клітинах K562, z – стекінг зображення. Ядра дофарбовані барвником DAPI (синє). Перекриття сигналів локалізації білків Vcr-Abl і USP1 (жовте)

Отримані показники MCC свідчать про високий рівень колокалізації білків Vcr-Abl/USP1 у клітинах K562. Так, згідно індексу M1 сигнали

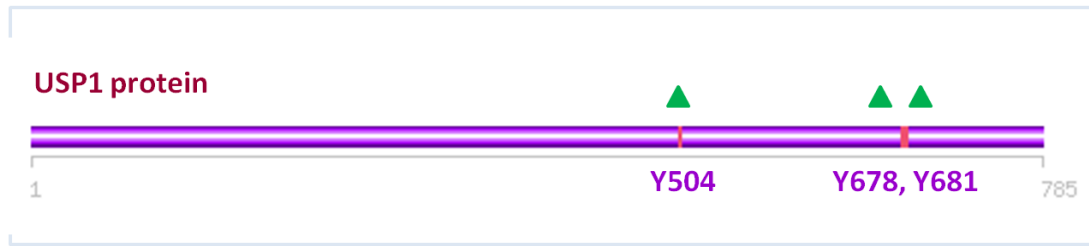
локалізації білка USP1 майже повністю перекриваються з сигналами локалізації онкобілком Bcr-Abl, у той час як онкобілок лише частково локалізований до USP1 (M2). Це можна пояснити тим, що відміну від деубіквітинази USP1, яка локалізується виключно у ядрі клітини, переважна більшість Bcr-Abl сконцентрована у цитоплазмі клітини і лише частково він зустрічається в ядрі, що фізично унеможлиблює високий рівень перекриття з деубіквітиназою USP1.

Таким чином, шляхом імунофлуоресцентного аналізу вперше показано ядерну колокалізацію онкобілка Bcr-Abl і білка USP1 у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії людини. Високий рівень кореляції та внутрішньоклітинної колокалізації білків Bcr-Abl/USP1 підтверджено за допомогою кількісного аналізу зображень.

**3.1.3. Визначення фосфорильованих форм білка USP1.** Онкобілок Bcr-Abl є тирозин-кіназою, яка безконтрольно фосфорилує свої білкові партнери. Тому після експериментального підтвердження прямої взаємодії кінази Bcr-Abl з білком USP1, ми вирішили перевірити наявність фосфорильованих за тирозином форм білка у клітинах K562. Роботу по визначенню фосфорильованого USP1, ми здійснили у декілька етапів. Спершу ми здійснили пошук можливих сайтів фосфорильовання на білкові USP1 за допомогою біоінформатичного аналізу. Експериментальне вивчення фосфорильованого білка USP1 здійснили за допомогою методу ко-імунопреципітації та імунофлуоресцентного аналізу клітин K562.

**3.1.3.1. Біоінформатичне передбачення сайтів фосфорильовання на білку USP1.** За допомогою веб-серверів «Disphos1.3», «KinasePhos», «NetPhos2.0 Server», «PhosphoPICK» ми спрогнозували Y504, Y678, Y681 сайти фосфорильовання для білку USP1 (рис. 3.8.). Послідовності ізоформ білку USP1 для аналізу отримали з бази даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації, (США).



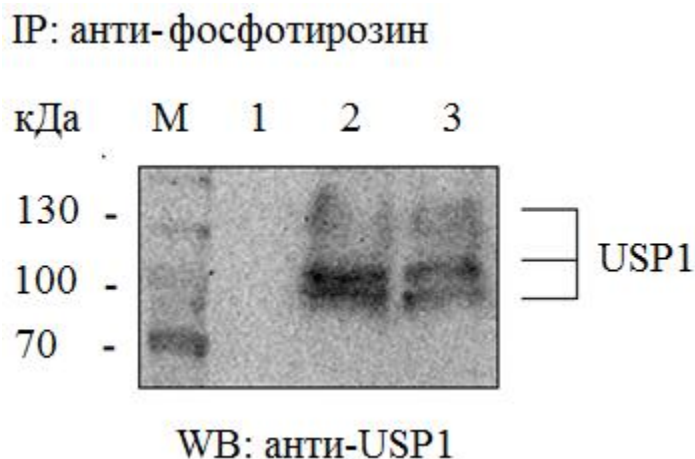


**Рис. 3.8.** Схема розташування потенційних сайтів фосфорилування за тирозином на USP1 (дані отримані за допомогою веб-серверів «Disphos1.3», «KinasePhos», «NetPhos2.0 Server», «PhosphoPICK» KinasePhos)

**3.1.3.2. Імунопреципітація фосфорильованих форм USP1 з лізатів K562.** За допомогою антитіл проти фосфотирозину було преципітовано фосфорильовані форми білка у клітинах K562. Для збереження фосфорильованих форм білка по сайтах тирозину, лізати клітин отримали з додаванням 2mMNaVO<sub>3</sub> до NP40 лізис буферу, оскільки NaVO<sub>3</sub> є потужним інгібітором фосфотирозинфосфатаз. Отримані результати імунопреципітації візуалізували за допомогою методу вестерн блот (рис. 3.9).

Аналіз блотограми підтвердив наявність фосфорильованих форм білка USP1 за сайтами тирозину у клітинах K562. Цікаво, що найбільш чітко проявляються саме ті ізоформи USP1, які взаємодіють із онкобілком Bcr-Abl. Тому, ми припускаємо, що саме взаємодія з кіназою Bcr-Abl може спричиняти появу фосфорильованого USP1 у клітинах K562. Наслідком цього може бути дерегуляція функцій білка USP1 за рахунок надмірної активації деубіквітинуючих властивостей.

**3.1.3.3. Імунофлуоресцентний аналіз фосфорильованих форм USP1.** Аналіз локалізації фосфорильованих форм USP1 у клітинах K562 здійснили за допомогою імунофлуоресцентного аналізу. Фосфорильовані білки ідентифікували антитілами проти фосфотирозину, а USP1 – анти-USP1 антитіл. Отримані результати візуалізували за допомогою конфокальної мікроскопії (рис. 3.10).

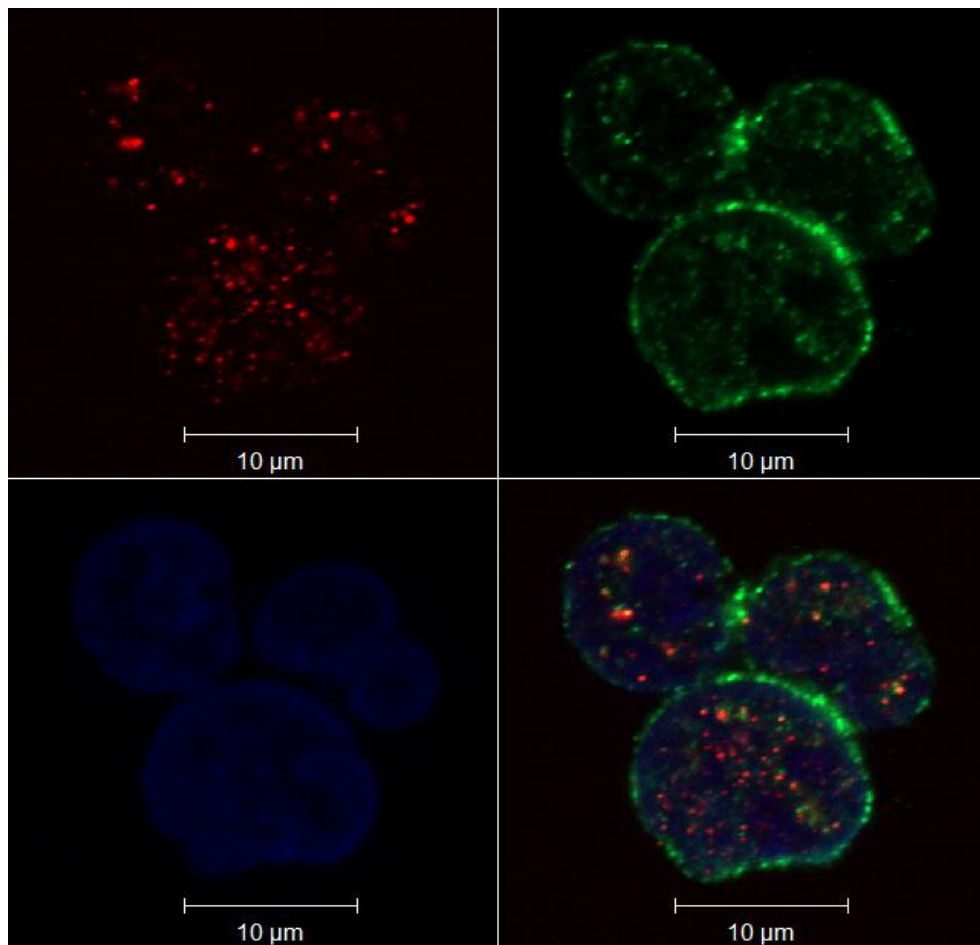


**Рис. 3.9.** Преципітації білків за допомогою антитіл проти фосфотирозину: 1 – інкубація агарози лише з лізатами клітин K562 (контроль), 2 – білок USP1, результати преципітації, 3 – білок USP1, лізати клітин K562 (контроль), М – маркер молекулярних мас Plus Prestained 10 250kDa Protein, IP – імунопреципітація, WB – вестерн блот

Таким чином ми з'ясували, що у клітинах K562 фосфорильовані по тирозину білки найчастіше зустрічаються біля мембрани клітини, що може бути наслідком кіназної активності онкобілка Bcr-Abl, оскільки значна його частина теж зосереджена на периферії клітини. Білок USP1 мав ядерну локалізацію, що відповідає попередньо встановленим даним. Аналіз зображень за допомогою програмного забезпечення Zeiss LSM Image Browser (рис. 3.10) показав присутність фосфорильованого за тирозином USP1 у ядрі клітин K562.

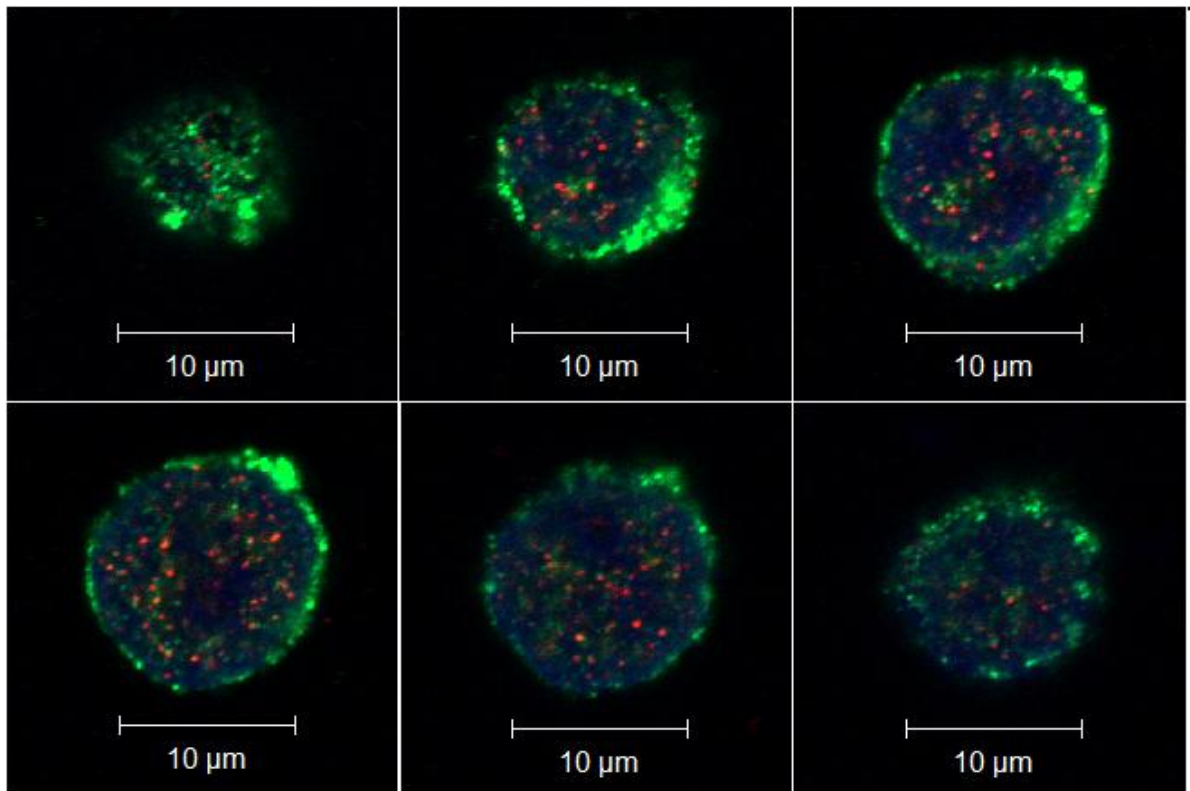
Згідно кількісному аналізу результатів (рис. 3.11) коефіцієнт кореляції Пірсона при ідентифікації зразків антитілами проти USP1 та проти фосфотирозину, становить 0,34, що свідчить про їх позитивну кореляцію. Коефіцієнт колокалізації Мандерса для M1, який відображає перекриття першого зонда (USP1) з другим зондом (фосфотирозин), становить 0,67, тобто переважна більшість USP1 у клітинах K562 знаходяться у фосфорильованій формі. Індекс M2, який відображає перекриття другого зонду (фосфотирозину) з першим зондом (USP1) складає лише 0,124, різке зниження показника для M2

у порівнянні з M1, відбувається за рахунок співвідношення перекриття з іншими фосфорильованими білками у клітинах K562.



**Рис. 3.10.** Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної локалізації білка USP1 (червоне) і онкобілка Vcr-Abl (зелене) у клітинах K562. Ядра дофарбовані барвником DAPI (синє). Перекриття сигналів локалізації білків Vcr-Abl і USP1 (жовте)

Таким чином, за допомогою біоінформатичного аналізу спрогнозовано Y504, Y678, Y681 сайти, які мають найбільшу ймовірність фосфорильовання на білкові USP1 мають. Експериментально підтверджено наявність фосфорильованих форм білка USP1 у ядрі клітинах K562, що може бути наслідком утворення білкового комплексу USP1/Vcr-Abl.



**Рис. 3.11.** Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної локалізації білка USP1 (червоне) і онкобілка Bcr-Abl (зелене) у клітинах K562, z – стекінг зображення. Ядра дофарбовані барвником DAPI (синє). Перекриття сигналів локалізації білків Bcr-Abl і USP1 (жовте)

**Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

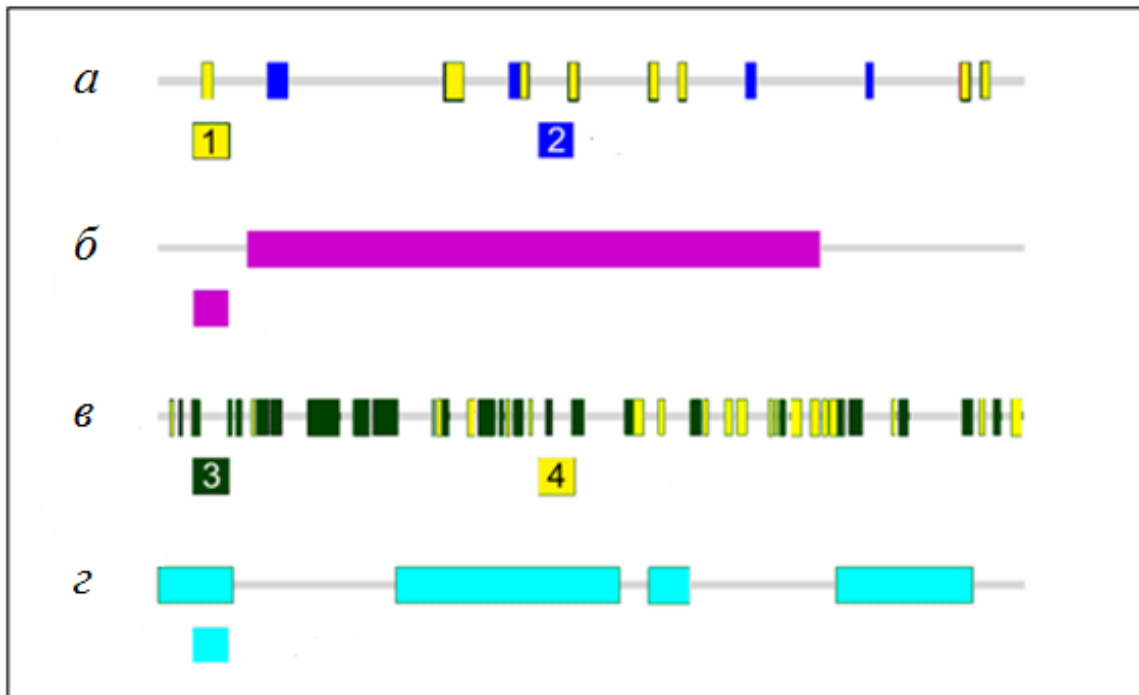
1. **Антоненко С**, Поліщук Ю, Телегєєв Г. Фосфорилування сайтів Tyr білка USP1 у клітинах K562 як фактор прогресії хронічної мієлоїдної лейкемії. Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. 2019;17(2):249-255.
2. **Antonenko S**, Telegeev G. Inhibition of USP1, a new partner of Bcr-Abl, results in decrease of Bcr-Abl levels in K562 cells. Experimental oncology. 2020;42(2):109-114.
3. **Antonenko S**, Cherepenko O, Telegeev G. Gene signatures in cancer may also overlap at the level of the product special domain organization and function: SW01. 38th FEBS congress; 2013 July 6-11, St.Petersburg, Russia.

4. **Antonenko S**, Telegeev G. USP1 as a potential partner of Bcr-Abl oncoprotein. VIII Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine dedicated to 90<sup>th</sup> Anniversary of P.G.Kostyuk; 2014 May 20-21, Kyiv, Ukraine.
5. **Antonenko S**, Gurianov D, Telegeev G. USP1 protein colocalizes with Bcr-Abl oncoprotein in K562 cells i acts as potential target for CML therapy. XI Parnas Conference - Young scientists forum biochemistry and molecular biology for innovative medicine; 2018 September 3-5, Kyiv, Ukraine.

## 3.2. Взаємодія PH домена онкобілка Src-Abl з білком USP1

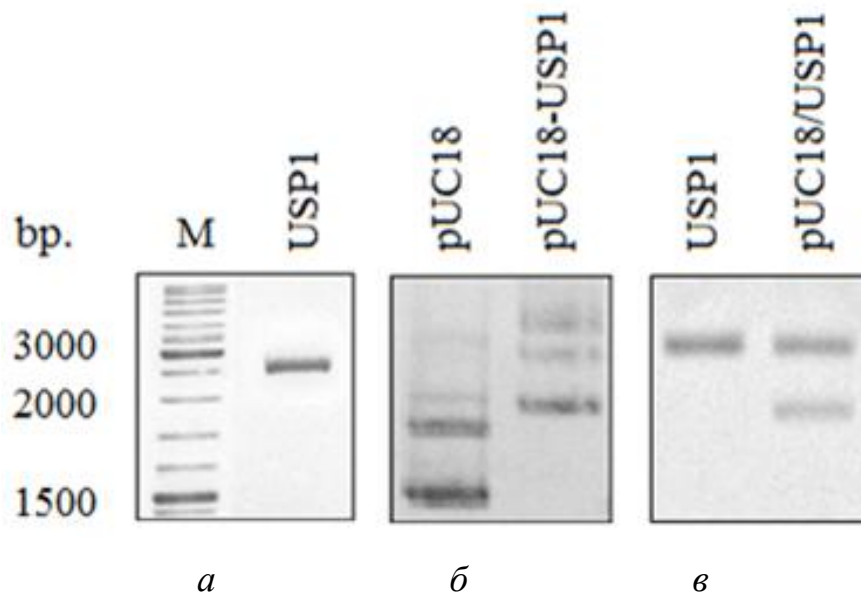
**3.2.1. Біоінформатичний аналіз білка USP1.** Біоінформатичний аналіз дозволяє спрогнозувати властивості білка, які можуть бути критичними при роботі *in vitro*, трансфекції рекомбінантних білків у культури клітин тощо. Одним з таких показників є розчинність білка. Тому перед початком створення плазмідних векторів для експресії, за допомогою веб-серверу Estimation of protein Expression and Solubility ми здійснили біоінформатичний аналіз послідовності білка USP1 (рис. 3.12). Таким чином, спрогнозували розташування розчинних і нерозчинних ділянок білка USP1, підраховали, що загальний відсоток розчинності білка складає близько 68 %, що є хорошим прогностичним показником для подальшої роботи з ним. Окрім цього, завдяки функції SS (PSIPRED) нам вдалося спрогнозувати розташування  $\beta$ -спіралей та  $\alpha$ -листів на білкові USP1, та передбачили, що консервативні ділянки білка USP1 локалізуються переважно в межах домена убіквітин карбоксил-термінальної гідролази, та становлять близько 65%. Виявили, чотири неупорядковані області білка USP1, дві з яких локалізовані в центральній частині білка та дві – на його периферії. У відсотковому співвідношенні неупорядковані області білка становлять близько 55%. Дане передбачення отримали за допомогою функції Disorder (POODLE-L). Слід, відмітити, що вивчення неупорядкованих ділянок білків є важливим для розуміння механізмів проходження різних біологічних процесів, зокрема таких як регуляція трансляції, клітинна сигналізація та убіквітин-протеосомної деградації білків.

Отримані за допомогою біоінформатичного аналізу дані щодо структури та властивостей деубіквітинази USP1, зокрема таких як наявність розчинних і не розчинних ділянок, присутність консервативних регіонів, неупорядкованих ділянок, особливості вторинної структури білка, були враховані при плануванні та проведенні експериментів за участі деубіквітинази, аналізі результатів досліджень.



**Рис. 3.12.** Результати біоінформатичного аналізу білка USP1: А – розташування розчинних (1) та нерозчинних (2) ділянок білка USP1; Б – консервативний регіон визначений за пріоритетом; В – вторинна структура білка USP1, розташування  $\beta$ -спіралей (3) та  $\alpha$ -листів (4); Г – невпорядковані області білка USP1

**3.2.2. Створення генетичних конструкцій pCMV-НА-USP1 і pEGFP-C3-USP1.** Кодуючу послідовність гена USP1 ампліфікували з використанням праймерів USP1 fwd(AATTGCCTGGTGTACATACCTAGTG) та USP1 rev (GAGAGACCAATAATATCCAGTAGC). Праймери були підібрані за допомогою програми PerlPrimer. В якості матриці використали плазмиду pCMV-XL5-USP1 з банку плазмід відділу молекулярної біології і генетики НАН України. Реакцію проводили відповідно до умов виробника з використанням високо специфічної ДНК Pfu полімерази. Реакційну суміш візуалізували за допомогою агарозного гелю електрофорезу з використанням маркера молекулярних мас Gene Ruler Plus DNA Ladder. Детектований фрагмент ДНК становив 2343 п.н., що відповідає очікуваному розміру кодуючої послідовності гена *USP1* (рис. 3.13).



**Рис. 3.13.** Отримання плазмідного вектору pUC18-USP1: *a* – кодуюча послідовність гена USP1 (2343 п.н.) отримана шляхом ПЛР реакції, розмір цільового фрагмента визначали за допомогою маркера молекулярних мас Plus Prestained 10 250kDa Protein Ladder (Thermo Scientifir); *б* – скринінг рекомбінантів за допомогою рестрикційного аналізу; *в* – скринінг рекомбінантів за допомогою ПЛР

Генетичну конструкцію pUC18-USP1 змоделивали з використанням програми Serial Cloner 2.6.1. Рестрикцію плазмідного вектора pUC18 здійснили за допомогою ендонуклеази рестрикції *SmaI*. Отриману лінеаризовану плазмідну ДНК очистили шляхом елюції із агарозного геля та дефосфорилували. Ампліфікований фрагмент кодуючої послідовності гена USP1 фосфорилували та лігували у вектор pUC18. Реакційну суміш трансформували у компетентні клітини *E.coli* штам DH5 $\alpha$  та культивували на агаризованому поживному середовищі LB з додаванням селективних агентів. Скринінг рекомбінантів здійснювали шляхом біло-блакитної селекції. Відібрані рекомбінанти аналізували за допомогою ПЛР реакції з використанням праймерів до кодуючої послідовності гена USP1 fwd (AATTGCCTGGTGTTCATACCTAGTG)

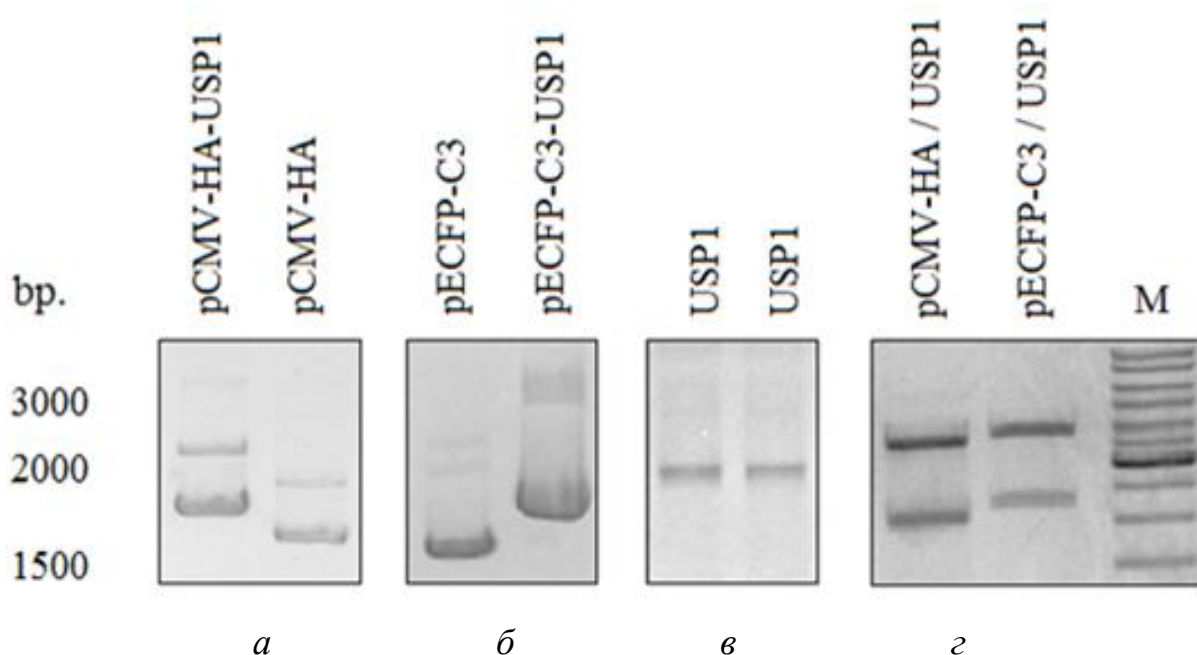


та rev(GAGAGACCAATAATATCCAGTAGC) та шляхом рестрикційного картування. Правильність рамки зчитування та відсутність мутацій у створеній генетичній конструкції pUC18-USP1 підтвердили шляхом секвенування.

Одним із завдань нашої роботи було експериментальне підтвердження взаємодії білка USP1 із доменом PH онкобілка Vcr-Abl. З цією метою, за допомогою програми Serial Cloner 2.6.1. ми змодельовали генетичну конструкцію для еукаріотичної експресії USP1 білка. Для її отримання субклонували кодуючу послідовність гена USP1 у плазмідний вектор pCMV-NA за допомогою EcoRI ендонуклеази рестрикції. Для детекції локалізації білка USP1 в еукаріотичних клітинах ми змодельовали генетичну конструкцію з використанням плазмідного вектора pEGFP-C3, який несе флуоресцентну мітку. Субклонування кодуючої послідовності гена USP1 у вектор pEGFP-C3 здійснили по *KpnI* і *EcoRI* сайтах рестрикції. Відбір та аналіз рекомбінантів здійснили за допомогою ПЛР реакції та шляхом рестрикційного картування (рис. 3.14). Коректність рамки зчитування та відсутність мутацій у створених плазмідних векторах pCMV-NA-USP1 і pEGFP-C3-USP1 підтверджено шляхом секвенування

Таким чином, шляхом молекулярно-генетичних методів ми створили плазмідні вектори pCMV-NA-USP1 і pEGFP-C3-USP1, які були використані для дослідження взаємодії та колокалізації білка USP1 і PH домену онкобілка Vcr-Abl у клітинах 293T.

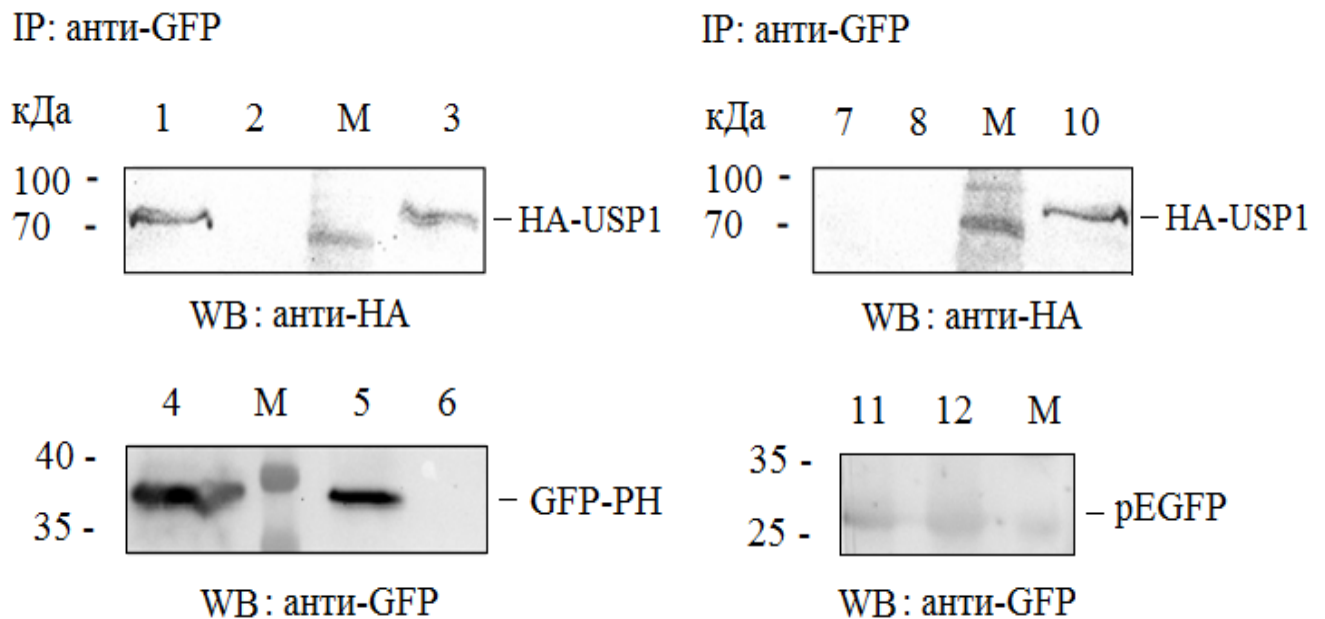
**3.2.3. Вивчення взаємодії PH домену і білка USP1 за допомогою методу ко-імунопреципітації.** Визначення взаємодії PH домену і білка USP1 здійснили за допомогою методу ко-імунопреципітації, який дозволяє виявляти існуючі білкові комплекси у лізатах клітин та інтерпретувати отримані дані на умови *in vivo*. Для аналізу обрали клітинну лінію 293T. Клітини культивували у середовищі DMEM з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки та необхідних антибіотиків. Після досягнення 70% конфлюентності клітини ко-трансфікували плазмідними векторами pEGFP-PH і pCMV-NA-USP1 з використанням трансфекційного агента PEI.



**Рис. 3.14.** Електрофореграма, скринінг цільових рекомбінантів: *a* – результати реакції лігування гена USP1 у плазмідний вектор pCMV-HA; *б* – результати реакції лігування гена USP1 у плазмідний вектор pECFP-C3; *в* – результати ПЛР, ампліфікати отримані на матриці pCMV-HA-USP1 та pECFP-C3-USP1; *г* – результати рестрикційного картування pCMV-HA-USP1 (*EcoRI*) та pECFP-C3-USP1 (*EcoRI*), розмір цільових фрагментів визначали за допомогою маркера молекулярної маси GeneRuler 1 kb DNA labber

У контрольному варіанті клітини 293Т трансфікували “порожнім” вектором 1. Ко-імунопреципітацію здійснили за допомогою антитіла проти тагу-GFP. Білки, які зв’язалися з даним антитілом розділили в поліакриламідному гелі та шляхом електропорації перенесли на нітроцелюлозну мембрану. Візуалізацію результатів здійснили за допомогою вестерн блот аналізу. Рекомбінантний білок USP1 детектували за допомогою антитіл проти HA, для візуалізації рекомбінантного домену РН використали антитіла проти GFP. Аналіз блотограми підтвердив наявність взаємодії між доменом РН та білком USP1. У контрольному варіанті, який передбачав ко

трансфекції рСМV-НА-USP1 з експресія плазмідного вектора рEGFP, утворення білкових комплексів з білком USP1 не спостерігалось (рис. 3.15).



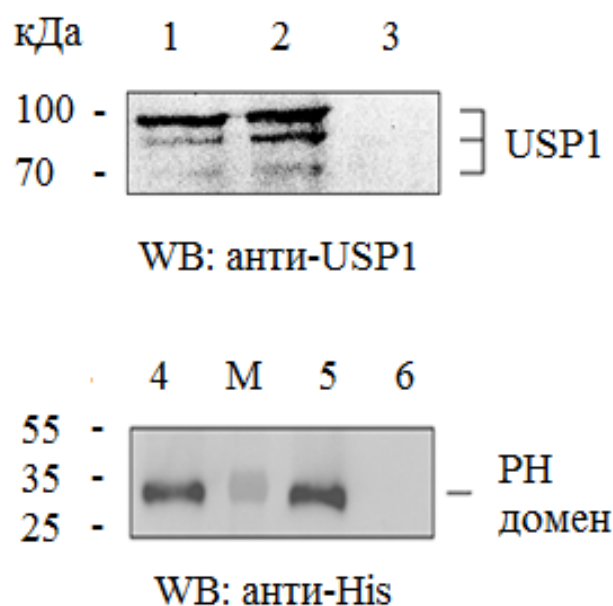
**Рис. 3.15.** Преципітація білків з лізатів клітин 293Т за допомогою антитіл проти GFP-мітки: 1 – рекомбінантний білок USP1-НА, результати преципітації; 2, 6, 8 – інкубація агарози лише з лізатами клітин 293Т, рекомбінантний білок USP1-НА; 3, 10 – лізати клітин 293Т, контроль; 4 – рекомбінантний білок PH-GFP, результати преципітації; 5 – рекомбінантний білок PH-GFP, лізати клітин 293Т, контроль; 11 – рекомбінантний білок рEGFP, результати преципітації; 12 – рекомбінантний білок рEGFP, лізати клітин 293Т, контроль; М – маркер молекулярної маси Plus Prestained 10-250kDa Protein Ladder (Thermo Scientifir) IP – імунопреципітація, WB – вестерн блот

Таким чином, за допомогою методу ко-імунопреципітації ми підтвердили взаємодію між рекомбінантним доменом PH онкобілка Vcr-Abl і білком USP1.

**3.2.4. Визначення взаємодії PH домену і білка USP1 за допомогою пул-даун аналізу.** Рекombінантний білок рЕТ-28с-PH експресували у клітини *E.coli* штам ArcticExpress (DE3) та очистили за допомогою афінної хроматографії з використанням Ni<sup>2+</sup>-NTA. Клітини K562 культивували у середовищі RPMI з додаванням 10 % фетальної бичачої сироватки та необхідних антибіотиків. Лізати клітин K562, отримані за допомогою NP40 лізис буферу з додаванням інгібіторів протеаз, наносили на колонку, яка містила рекombінантний PH домен. Після інкубації, відмивки солей та елюцію білків, що зв'язались з колонкою, отримані зразки розділяли в поліакриламідному гелі та шляхом електропорації переносили на нітроцелюлозну мембрану. Результати візуалізували за допомогою вестерн блот аналізу. Ендогенний білок USP1 детектували антитілами проти USP1 та антитілами проти His-тагу. Аналіз блотограми підтвердив наявність взаємодії між рекombінантним домену PH онкобілка Vcr-Abl з нативним білком USP1 (рис. 3.16). Цікаво, що PH домен зв'язується з усіма трьома ізоформи білка USP1, в той час як із повнорозмірним білком Vcr-Abl взаємодіють лише дві із них. Ми припускаємо, що причиною цьому можуть бути особливості третинної структури онкобілка чи пострасляційні модифікації, які унеможливають взаємодію Vcr-Abl із третьою ізоформою USP1.

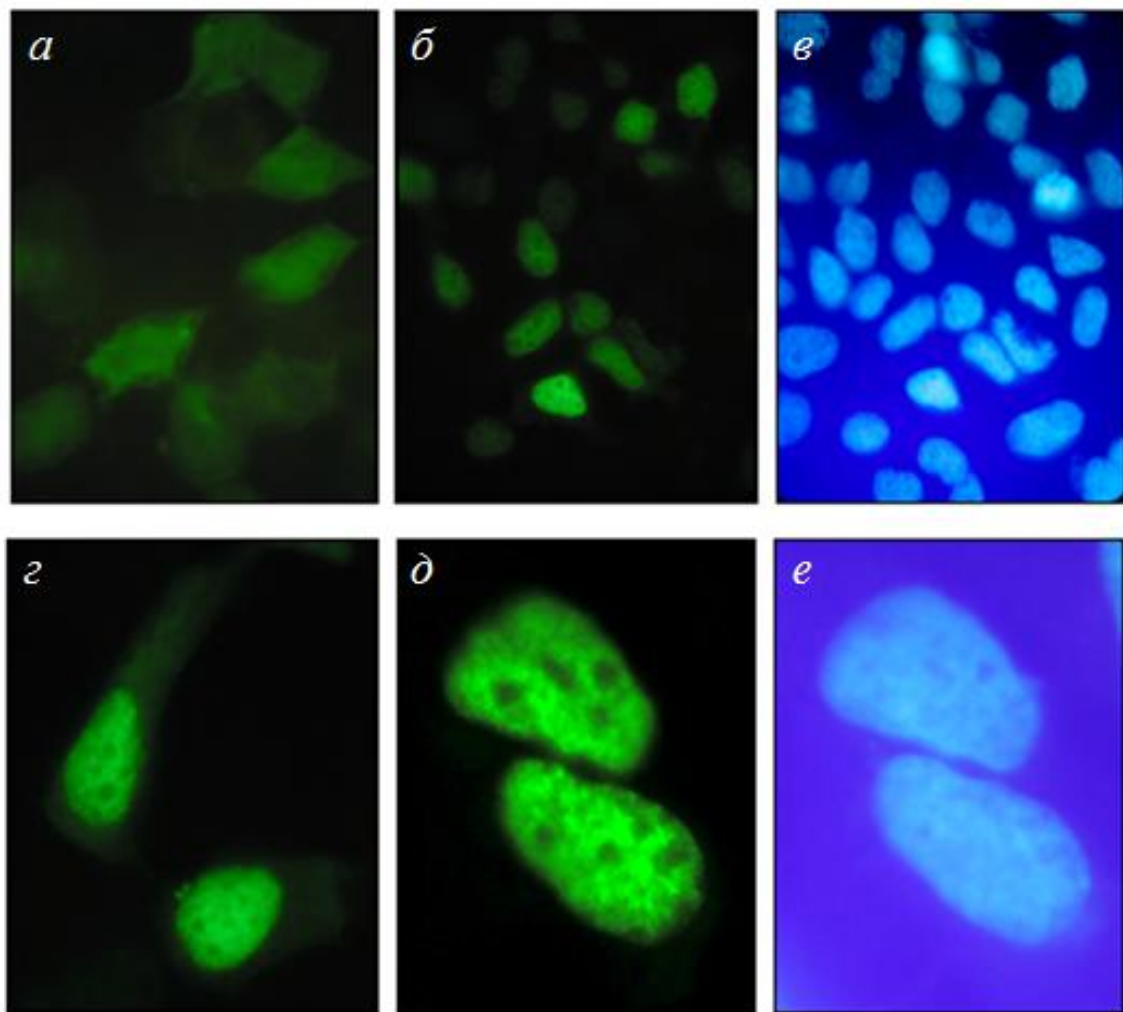
Отже, за допомогою пул-даун аналізу ми встановили пряму взаємодію рекombінантного домену PH онкобілка Vcr-Abl із нативним USP1.

**3.2.5. Визначення субклітинної локалізації білкового комплексу PH/USP1.** У попередніх розділах ми підтвердили утворення білкового комплексу USP1/PN, тому наступне завдання дисертаційної роботи полягало у визначенні його внутрішньоклітинної локалізації. Попередньо ми встановили, що ендогенний білок USP1 у клітинах K562 локалізується у ядрі. Для визначення локалізації рекombінантного білка USP1 у клітинах 293T ми трансфікували їх плазмідним вектором рЕСFP-C3-USP1 та культивували протягом 24 год. у середовищі DMEM з додаванням всіх необхідних речовин.



**Рис. 3.16.** Пул-даун аналіз взаємодії домену PH і білка USP1 за допомогою антитіл проти His-тагу: 1 – експресія білка USP1, лізати клітин K562 (контроль), 2 – білок USP1, результати пул-даун аналізу, 3, 6 – негативний контроль, результати інкубації сефарози G з лізатами клітин K562, без участі специфічних антитіл, 5 – рекомбінантний His-PH домен, результати пул-даун аналізу, M – маркер молекулярних мас Plus Prestained 10-250kDa Protein Ladder (Thermo Scientific, США)

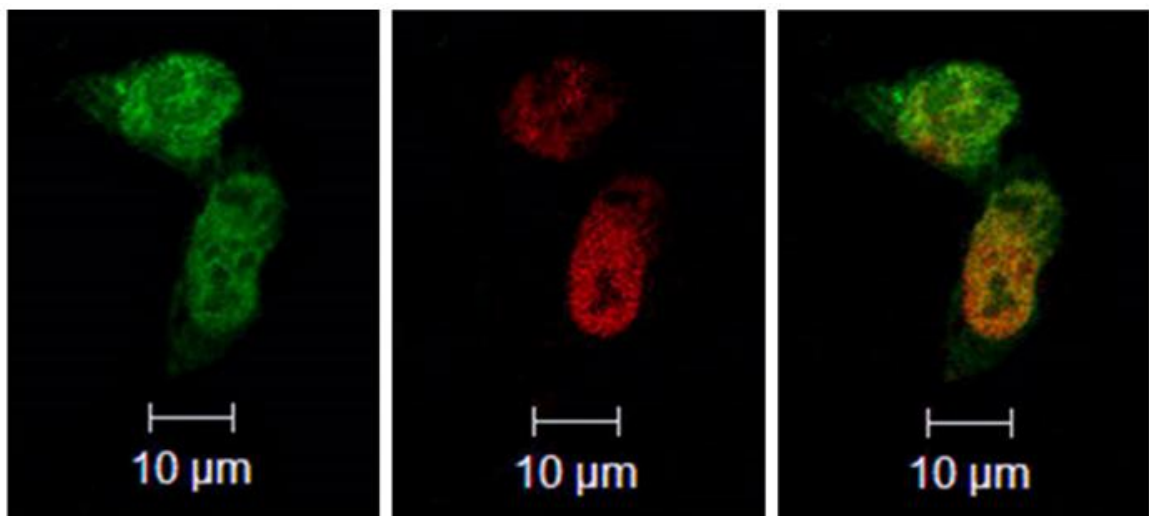
У контрольному варіанті клітини трансфікували «порожнім» плазмідним вектором рЕСFP-С3. Аналіз результатів за допомогою флуоресцентної мікроскопії, показав, що рекомбінантний білок USP1 має характерну для ендogenous білка ядерну локалізацію (рис. 3.17). Плазмідний вектор рЕСFP-С3 локалізувався рівномірно по всій клітині, без визначених місць скупчення. Дослідження колокалізації білків здійснили шляхом котрансфекції плазмідних векторів рЕСFP-С3-USP1 та рmCitrineC1-PH у клітини 293T. Трансфіковані клітини 293T культивували протягом 24 год. у середовищі DMEM з додаванням 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби та відповідних антибіотиків.



**Рис. 3.17.** Експресія плазмідних векторів pECFP-C3 і pECFP-C3-USP1 у клітинах 293Т: *а* - pECFP-C3, флуоресценція ECFP (x40), *б* – pECFP-C3-USP1, ECFP флуоресценція (x40), *в* – флуоресценція DAPI (x40), *г* – pECFP-C3-USP1, ECFP флуоресценція (x60), *д* – pECFP-C3-USP1, ECFP флуоресценція (x100), *е* – флуоресценція DAPI (x100)

Візуалізацію отриманих результатів здійснили за допомогою конфокальної мікроскопії та програмного забезпечення Zeiss LSM Image Browser. З'ясовано, що рекомбінантний білок РН переважно локалізується в ядрі клітини, хоча незначна його частина зустрічається і в цитоплазмі клітини. Шляхом накладання двох зображень, ми детектували перекриття рекомбінантних білків РН і USP1 у клітинах 293Т (рис. 3.18). Як і очікувалося,

«злиті точки» локалізації білків PH і USP1 були зосереджені у ядрі клітини. Колокалізацію білків було підтверджено і за допомогою кількісного аналізу результатів. Так коефіцієнт кореляції Пірсона становив 0,53, що вказує на позитивний рівень лінійної кореляції досліджуваних зразків. Високі показники були зафіксовані і для коефіцієнта колокалізації Мандерса – 0,8, що свідчить про високий рівень перекриття сигналів локалізації білків PH і USP1.



**Рис. 3.18.** Конфокальна мікроскопія, аналіз локалізації рекомбінантних білків PH (зелене) та USP1 (червоне) у клітинах 293Т. Перекриття сигналів локалізації PH і USP1 (жовте)

Отже, шляхом ко-трансфекції плазмідних векторів pmCitrineC1-PH, pEGFP-C3-USP1 детектовано ядерну колокалізацію домену PH онкобілка Vcr-Abl з білком USP1 у клітинах 293Т.

**Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

1. Гур'янов Д, Лисецька Т, Кравчук І, **Антоненко С**, Телегеев Г.Д. Роль домену PH білка BCR у клітинних процесах, що визначають фенотип Ph<sup>+</sup>-позитивних мієлопроліферативних захворювань. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2014;15:44-48.
2. **Антоненко С**, Кравчук І, Гур'янов Д, Телегеев Г. Убіквітин специфічна протеаза 1 (USP1) – потенційний партнер Bcr-Abl онкобілку: біоінформатичний аналіз та отримання рекомбінантних конструкцій. Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. 2014;12(2):249-255.
3. **Antonenko S**, Gurianov D, Telegeev G. Colocalization of USP1 and PH domain of BCR-ABL oncoprotein in terms of chronic myeloid leukemia cell rearrangements. Cytology and Genetics. 2016;50(4):11-15.
4. **Антоненко С**, Гур'янов Д, Телегеев Г. Створення генетичних конструкцій для виявлення молекулярних особливостей розвитку ХМЛ . Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017;20:47-52.
5. **Антоненко С**, Гур'янов Д, Кравчук І, Телегеев Г. Аналіз клітинної локалізації PH домена Bcr-Abl з білком USP1 та розробка програми для оцінки їх сайтів фосфорилування. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2018;22:90-95.
6. **Antonenko S**, Telegeev G. USP1 as a potential partner of Bcr-Abl oncoprotein. VIII Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine dedicated to 90<sup>th</sup> Anniversary of P.G.Kostyuk; 2014 May 20-21, Kyiv, Ukraine.
7. **Antonenko S**, Gurianov D, Telegeev G. Colocalization of USP1 protein and PH domain Bcr-Abl oncoprotein as precondition of their interaction with CML. CYS conference of Young Scientists; 2015 September 21-25, Kyiv, Ukraine.
8. Дуридівка О., **Антоненко С**. Створення генетичної конструкції рCMV-NA-USP1 для еукаріотичної експресії рекомбінантного білка USP1. X

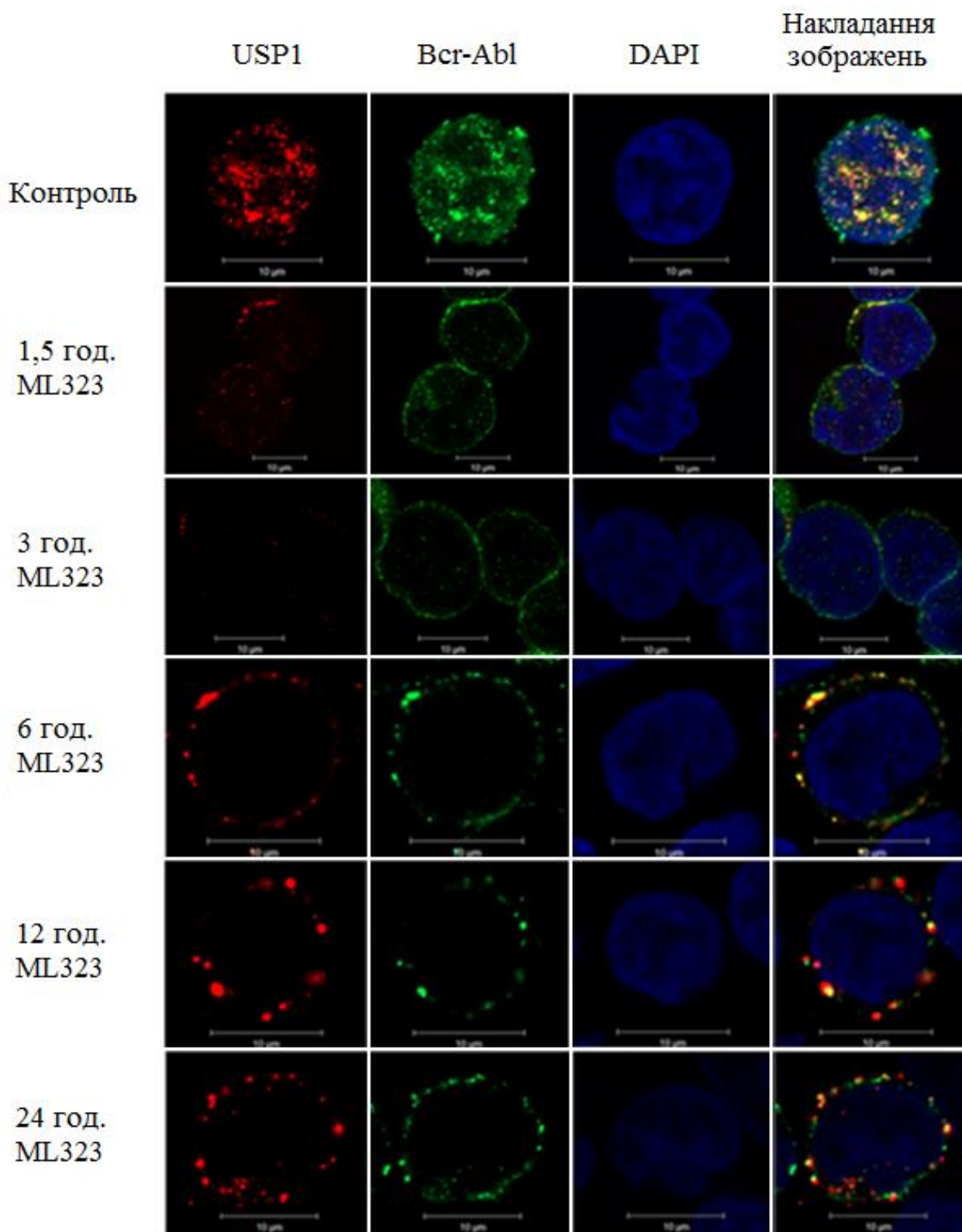


- Міжнародна конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери»; 2015 грудень 2-4, Харків, Україна.
9. **Antonenko S**, Telegeev G. Colocalization of USP1 protein and PH domain of Bcr-Abl oncoprotein in HEK293 cells. XI Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine dedicated to 160<sup>th</sup> Anniversary of M. F. Kastschenko; 2015 May 26-27, Kyiv, Ukraine.
  10. Gurianov D, **Antonenko S**, Telegeev G. Colocalization analysis shows the role of PH domain of BCR in proteasomal degradation and clathrin-mediated endocytosis. Young Scientist Forum «Molecules in Living Cells and in Innovative Medicine»; 2016 July 10-12, Wrocław, Poland.
  11. **Антоненко С**, Гурянов Д, Кравчук І, Телегєєв Г. Колокалізація USP1 і CTTN із PH доменом онкобілка та їх роль у розвитку ХМЛ. XIII з'їзд онкологів та радіобіологів України; 2016 травень 26-28, Київ, Україна.
  12. Gurianov D, **Antonenko S**, Kravchuk I, Telegeev G. Colocalization analysis shows that PH domain of BCR may play role in proteasomal degradation and clathrin-mediated endocytosis through proteins CTTN and USP1 but unlikely to influence cell adhesion. 41th FEBS congress; 2016 September 3-8, Kuşadası, Turkey.
  13. **Antonenko S**, Gurianov D, Kravchuk I, Telegeev G. Role of USP1, CORTACTIN and HSP27 proteins in molecular mechanisms that affect CML development. International Scientific Conference Normal and cancer stem cells: discovery, diagnosis and therapy; 2017 October 5–6, Kyiv, Ukraine.
  14. Gurianov D, **Antonenko S**, Telegeev G. Possible role of PH domain of Bcr in molecular pathways that determine the phenotype of myeloproliferative disorder in Bcr-Abl positive leukemias. LIMSC – 10th Leiden International (Bio) Medical Student Conference; 2017 March 15, Leiden, Netherlands.
  15. **Antonenko S**, Telegeev G. Interaction of USP1 protein and PH domain of Bcr protein and its role in Bcr-Abl evasion from proteasomal degradation. II International Conference Tumor and Host: Novel Aspects of Old Problem; 2019 November 21–22, Kyiv, Ukraine.

### 3.3. Визначення впливу деубіквітинази USP1 на онкобілок Vcr-Abl

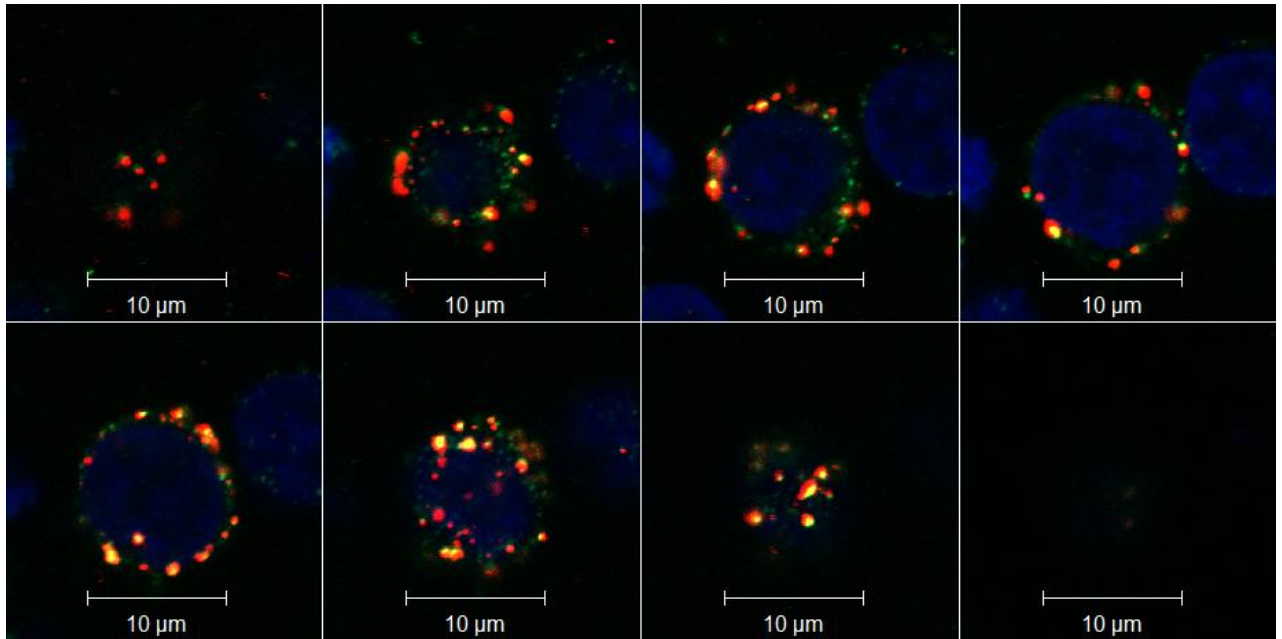
Деубіквітиназа USP1 належить до основних протеаз убіквітин-протеосомної системи деградації, вона має широкий спектр білок-білкових взаємодій, порушення яких є причиною онкопатологій. Для з'ясування наслідків взаємодії з онкобілком Vcr-Abl у клітинах K562, активність деубіквітинази USP1 інгібували за допомогою високо-специфічного інгібітора ML323. Наслідки порушення активності білка USP1 вивчали за допомогою імунофлуоресцентного методу та вестерн блот аналізу.

**3.3.1. Дослідження колокалізація білків Vcr-Abl/USP1 під впливом інгібітора ML323.** До клітин K562, які культивували у середовищі RPMI, вносили 76 нМ інгібітора ML323 та інкубували протягом 24 год. Для вивчення локалізації білків клітини відбирали через 1,5 год., 3 год., 6 год., 12 год., 24 год., після внесення інгібітора ML323 та аналізували за допомогою імунофлуоресцентного методу та конфокальної мікроскопії (рис. 3.19). Таким чином, ми виявили, що через 1,5 год. після інкубації білок USP1 має ядерну та цитоплазматичну локалізацію, хоча в контрольному варіанті білок знаходився виключно в ядрі клітини. Через 3 год. інкубації з інгібітором ML323 білок USP1 має майже виключно цитоплазматичну локалізацію. Слід відмітити і зміни в колокалізації білків Vcr-Abl/USP1, так на третю год. інкубації з ML323 коефіцієнт кореляції Пірсона знизився з 0,63 до 0,23 у порівнянні з контролем. Коefіцієнт колокалізації Мандерса для M1, який відображає показник перекриття білка USP1 з онкобілком Vcr-Abl, знизився з 0,91 до 0,44 порівняно з контролем, для M2 показники знизилися з 0,58 до 0,05, що свідчить про майже повну відсутність перекриття сигналів локалізації онкопротеїну Vcr-Abl з білком USP1. Через 6 год., 12 год. та 24 год. інкубації з інгібітором ML323 білок USP1 зберігає цитоплазматичну локалізацію. Разом з цим змінюється і місце колокалізації білків з ядерної на цитоплазматичну, оскільки після 6 год. культивування з інгібітором ML323, онкобілок Vcr-Abl теж локалізується



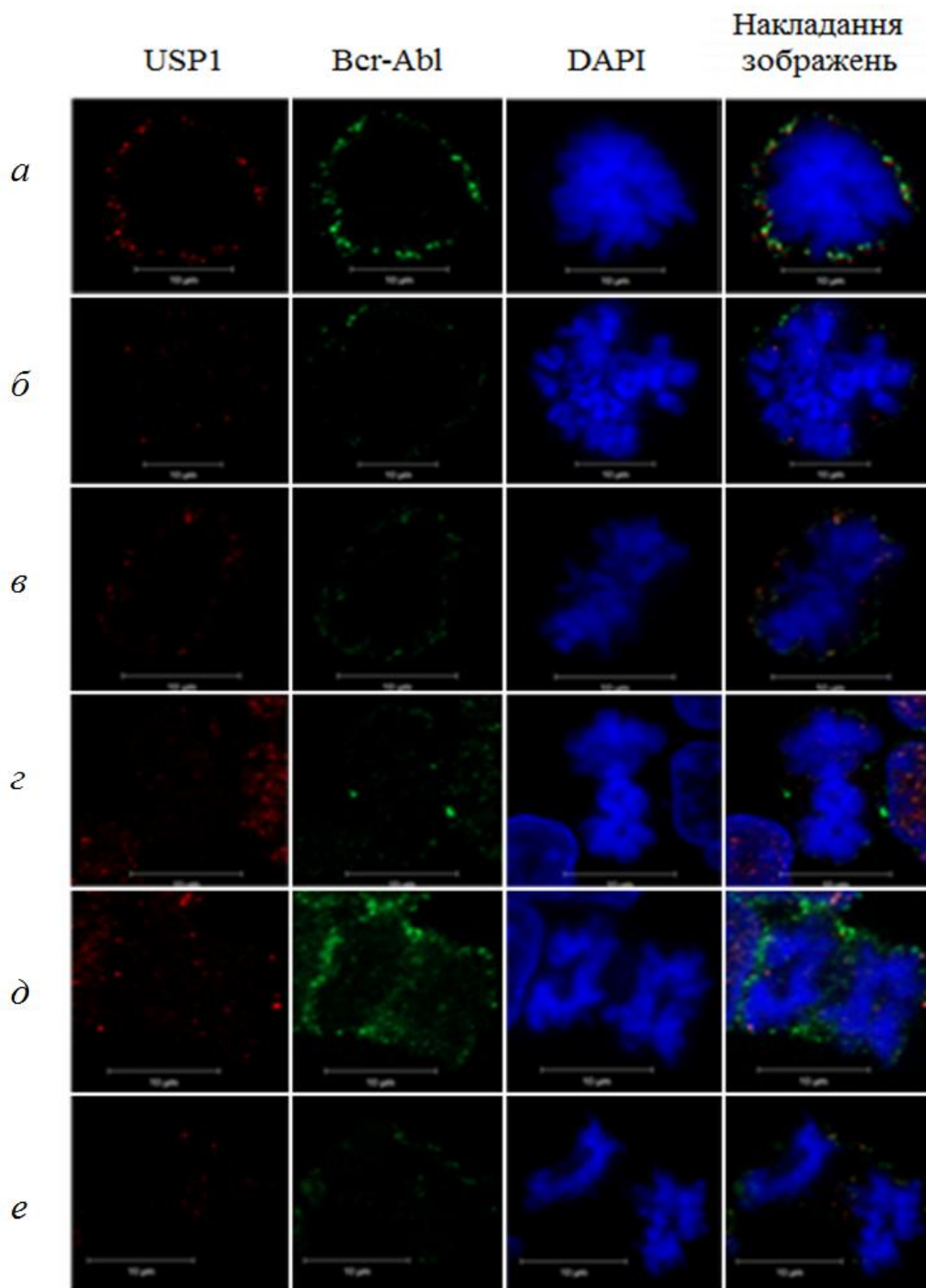
**Рис. 3.19.** Імунофлуоресцентний аналіз клітин K562 після інкубація з 76 нМ ML323. Білок USP1 (червоне), онкобілок Bcr-Abl (зелене). Ядра клітин дофарбовані ДНК-зв'язувальним барвником DAPI (синє). Перекриття сигналів локалізації білків Bcr-Abl і USP1 (жовте)

переважно у цитоплазмі клітини, крім того через 6 год. з ML323 починає зростати і рівень колокалізації білків Vcr-Abl/USP, та станом на 24 год. коефіцієнт кореляції Пірсона становить 0,53, а коефіцієнт колокалізації Мандерса M1 становить 0,61, а M2 – 0,345 (рис. 3.20).



**Рис. 3.20.** Імунофлуоресцентний аналіз клітин K562 після інкубація з 76 нМ ML323, протягом 24 год., z-стекинг зображення конфокальної мікроскопії. Білок USP1 (червоне), онкобілок Vcr-Abl (зелене). Ядра дофарбовані ДНК-зв'язувальним барвником DAPI (синє). Перекриття сигналів локалізації білків Vcr-Abl і USP1 (жовте)

Показано, що на відміну від контрольного варіанту (рис. 3.6.), де колокалізація білка Vcr-Abl/USP1 у період поділу клітин K562 зберігається, після трьох 3 год. інкубації з 76 нМ ML323 перекриття сигналів для білків Vcr-Abl/USP1 не було зафіксовано (рис. 3.21), що свідчить про порушення утворення білкового комплексу цільових білків. Слід відмітити, що за таким фізіологічних умов власне рівень деубіквітинази USP1 у клітинах K562 був досить низьким, зокрема у періоди метафази та анафази мітозу.

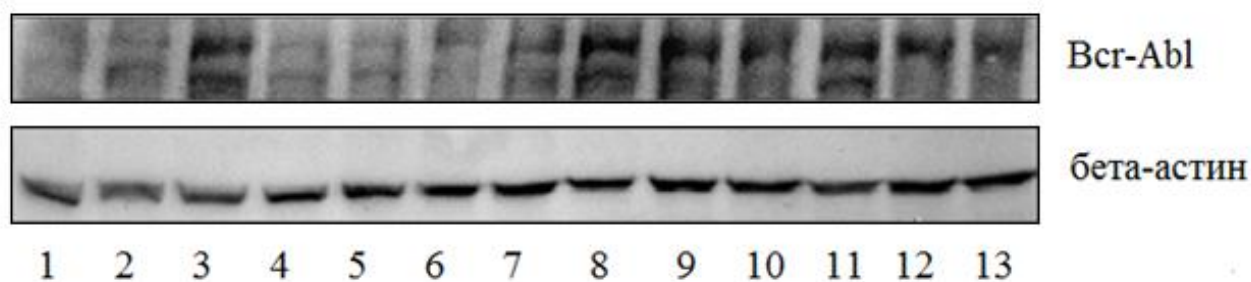
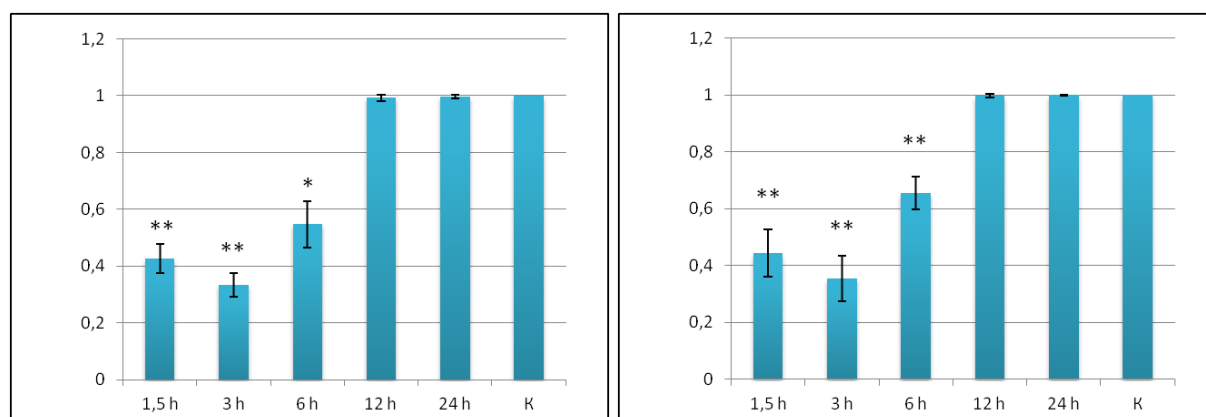


**Рис. 3.21.** Імунофлуоресцентний аналіз клітин K562 після інкубація з 76 нМ ML323, протягом 24 год., z-стекинг зображення конфокальної мікроскопії. Білок USP1 (червоне), онкобілок Vcr-Abl (зелене). Ядра дофарбовані ДНК-зв'язувальним барвником DAPI (синє). Перекриття сигналів локалізації білків Vcr-Abl і USP1 (жовте)

Таким чином, вперше експериментально показано, що інгібування білкового комплексу USP1/UAF1 за допомогою ML323 визначає цитоплазматичну локалізацію USP1 у клітинах K562. Встановлено, що інгібування активності деубіквітинази USP1 супроводжується зниженням колокалізації Bcr-Abl/USP1 білків під час інтерфази та в період поділу клітин.

**3.3.2. Вивчення залежності між активності білка USP1 та рівнем онкобілка Bcr-Abl.** Після виявлення білок-білкової взаємодії між Bcr-Abl та USP1, одним із головних завдань роботи було вивчення залежності між активністю деубіквітинази USP1 та рівнем онкобілка Bcr-Abl у клітинах. Для виконання поставленого завдання, до клітин K562, які культивували у середовищі RPMI з 10% сироватки великої рогатої худоби, додавали 56 нМ/76 нМ інгібітору ML323 та інкубували протягом 24 год. Для аналізу рівня онкобілка Bcr-Abl, клітини відбирали через 1,5 год., 3 год., 6 год., 12 год., 24 год. після внесення інгібітору ML323. Лізати клітин розділяли за допомогою поліакриламідного гелю та вивчали за допомогою вестерн блот аналізу з використанням антитіл проти Bcr-Abl (рис. 3.22а). Аналіз результатів показав, що через 1,5 год. інкубації з ML323 рівень онкобілка Bcr-Abl у порівнянні з контролем значно знижується (в середньому на 57% для зразка з 56 нМ ML323 та в 55% для зразка з 76 нМ ML323). На третю годину інкубації показники рівня онкобілка продовжують знижуватися, так в середньому зниження складає 67% для зразка з 56 нМ ML323 та 65% для зразка з 76 нМ ML323. Через 6 год. культивації з інгібітором ML323 рівень онкобілка Bcr-Abl починає зростати і на 12 год. досягає рівня контрольного варіанту. Через 24 год. – рівень онкобілка Bcr-Abl відповідає рівню контрольного варіанту. Статистичну обробку даних здійснили за допомогою t-тесту Стьюдента (рис. 3.22б,в).

Отже, вперше продемонстровано кореляцію між активністю деубіквітинази USP1 та рівнем онкобілка Bcr-Abl у клітинах K562.

*a**б**в*

**Рис. 3.22.** Вплив деубіквітинази USP1 на онкобілок Src-Abl: *a* – аналіз рівня онкобілка Src-Abl у клітинах K562 після інкубації з 52 nM ML323, вестерн блот аналіз (1) інкубація з 52 нМ ML323 протягом 1,5 год., (2) інкубація з 76 нМ ML323 протягом 1,5 год., (4) інкубація з 52 нМ ML323 протягом 3 год., (5) інкубація з 76 нМ ML323 протягом 3 год., (6) інкубація з 52 нМ ML323 протягом 6 год., (7) інкубація з 76 нМ ML323 протягом 6 год., (9) інкубація з 52 нМ ML323 протягом 12 год., (10) інкубація з 76 нМ ML323 протягом 6 годин 12 год., (12) - інкубація з 52 нМ ML323 протягом 24 годин, (13) інкубація з 76 нМ ML323 протягом 24 годин, (3,8,11) лізати клітин K562 культивовані без інгібітора ML323; *б, в* - результати статистичного аналізу рівня онкобілка Src-Abl після інкубації з інгібітором ML323 (*б* - 52 nM, *в* - 76 nM ML323), де \* - статистично значущий результат

**Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

1. **Antonenko S, Telegeev G.** Inhibition of USP1, a new partner of Bcr-Abl, results in decrease of Bcr-Abl levels in K562 cells. *Experimental oncology.* 2020;42(2):109-114.



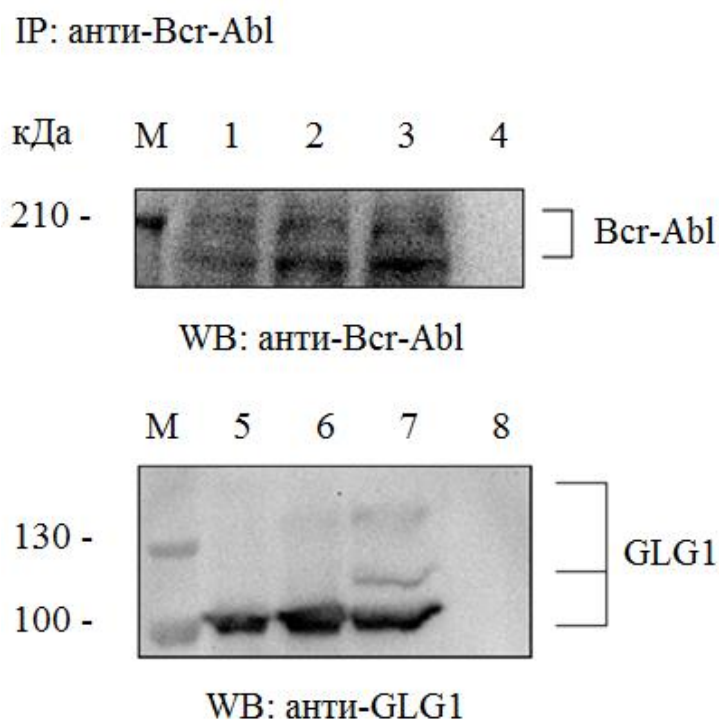
### 3.4.1. Білковий комплекс Vcr-Abl/GLG1 у клітинах K562

**3.4.1. Взаємодія білка GLG1 з онкобілком Vcr-Abl.** Як зазначено у літературному огляді, для білка GLG1 характерна наявність трьох ізоформ, які по різному зустрічаються у клітинах залежно від їх диференційних та функціональних особливостей. Аналіз лізатів за допомогою методу вестерн блот з використанням антитіл проти GLG1 показав присутність трьох ізоформ білка у клітинах K562. Дослідження взаємодії між онкобілком Vcr-Abl і білком GLG1 здійснили за допомогою методу ко-імунопреципітації з використанням антитіл проти GLG1. Отримані зразки розділяли за допомогою поліакриламідного геля та шляхом електропорації переносили на нітроцелюлозну мембрану. Результати візуалізували шляхом вестер блот аналізу з використанням антитіл проти Vcr-Abl і проти GLG1. Аналіз блотограми підтвердив наявність білкової взаємодії між онкобілком Vcr-Abl і білком GLG1 (рис. 3.23). Слід відмітити, що онкобілок Vcr-Abl взаємодіє лише з однією ізоформою білка GLG1, яка є найбільш представленою у клітинах K562. Причиною, цьому може бути характерний для ізоформи GLG2 альтернативний сплайсинг, який в подальшому призводить до зміни у формуванні молекулярних зв'язків, участі ізоформ білка GLG1 у сигнальних шляхах, функціональної активності тощо.

Таким чином, вперше показано пряму взаємодію онкобілка Vcr-Abl і білка GLG1 у клітинах K562.

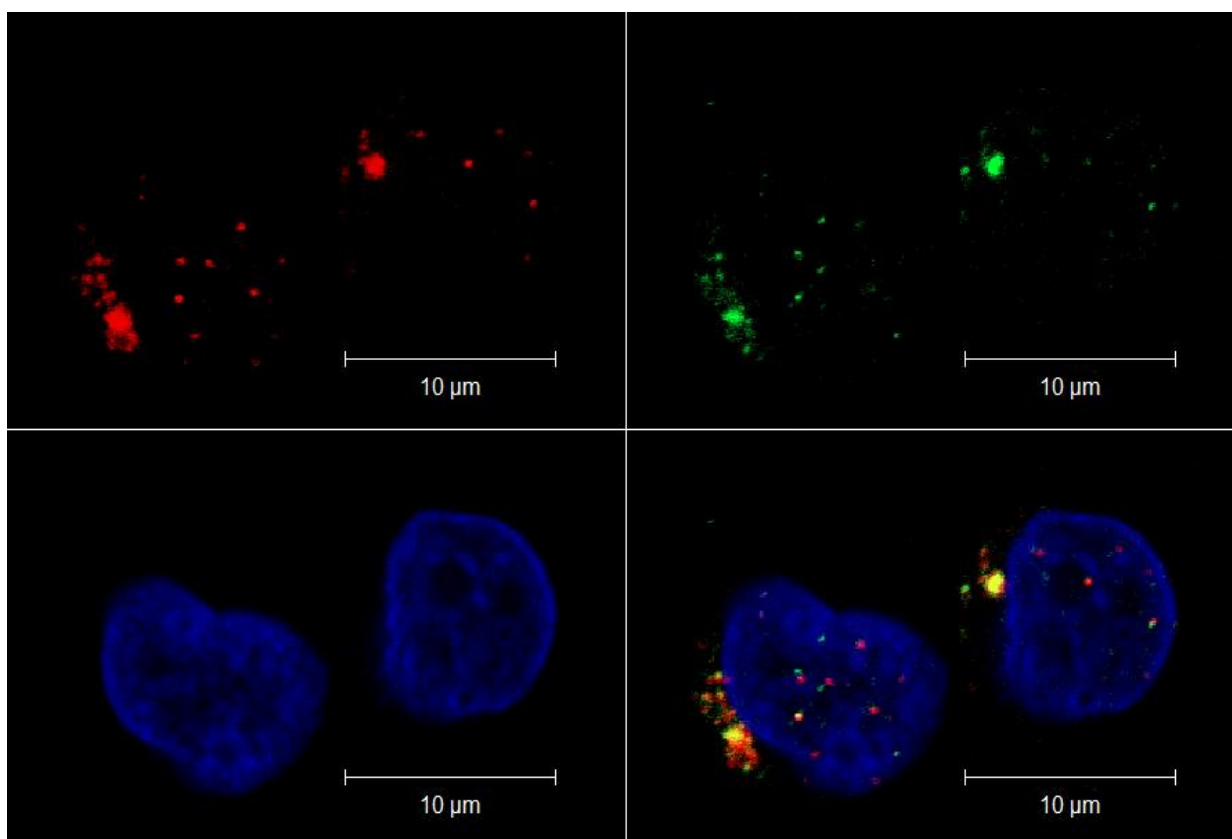
**3.4.2. Колокалізація білків Vcr-Abl/GLG1 у комплексі Гольджі.** Після експериментального підтвердження взаємодії білків Vcr-Abl і GLG1 у клітинах K562, наступним завданням роботи було визначення внутрішньоклітинної локалізації даного білкового комплексу. Відомо, що білок GLG1 може знаходитися як на мембрані клітини так і в комплексі Гольджі.

З літературних джерел, про особливості локалізації білка GLG1 у клітинах K562, дізнатися не вдалося.



**Рис. 3.23.** Преципітація ендогенних білків з лізату клітин K562, за допомогою антитіл проти Vcr-Abl: 1 - Vcr-Abl, лізати клітин K562 (контроль); 2, 3 – Vcr-Abl, результати преципітації; 4, 8 – інкубація агарози лише з лізатами клітин K562; 5, 6 – білок GLG1, результати преципітації; М – маркер молекулярних мас, Plus Prestained 10-250kDa Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США); IP – імунопреципітація; WB – вестерн блот

Тому перш ніж переходити до вивчення місця утворення білкового комплексу Vcr-Abl/GLG1, ми детектували локалізацію ендогенного білка GLG1 у клітинах K562 за допомогою імунофлуоресцентного методу з використанням антитіл проти GLG1. Маркерні сигнали локалізації отримали за допомогою антитіла специфічні до комплексу Гольджі. Результати візуалізували шляхом конфокальної мікроскопії. Таким чином, ми встановили, що у клітинах K562, основним місцем локалізації білка GLG1 є комплекс Гольджі. Отримані результати узгоджуються з літературними даними, які свідчать, що у переважній більшості ракових клітин, до яких належать і клітини K562, білок GLG1 знаходиться у комплексі Гольджі (рис. 3.24).

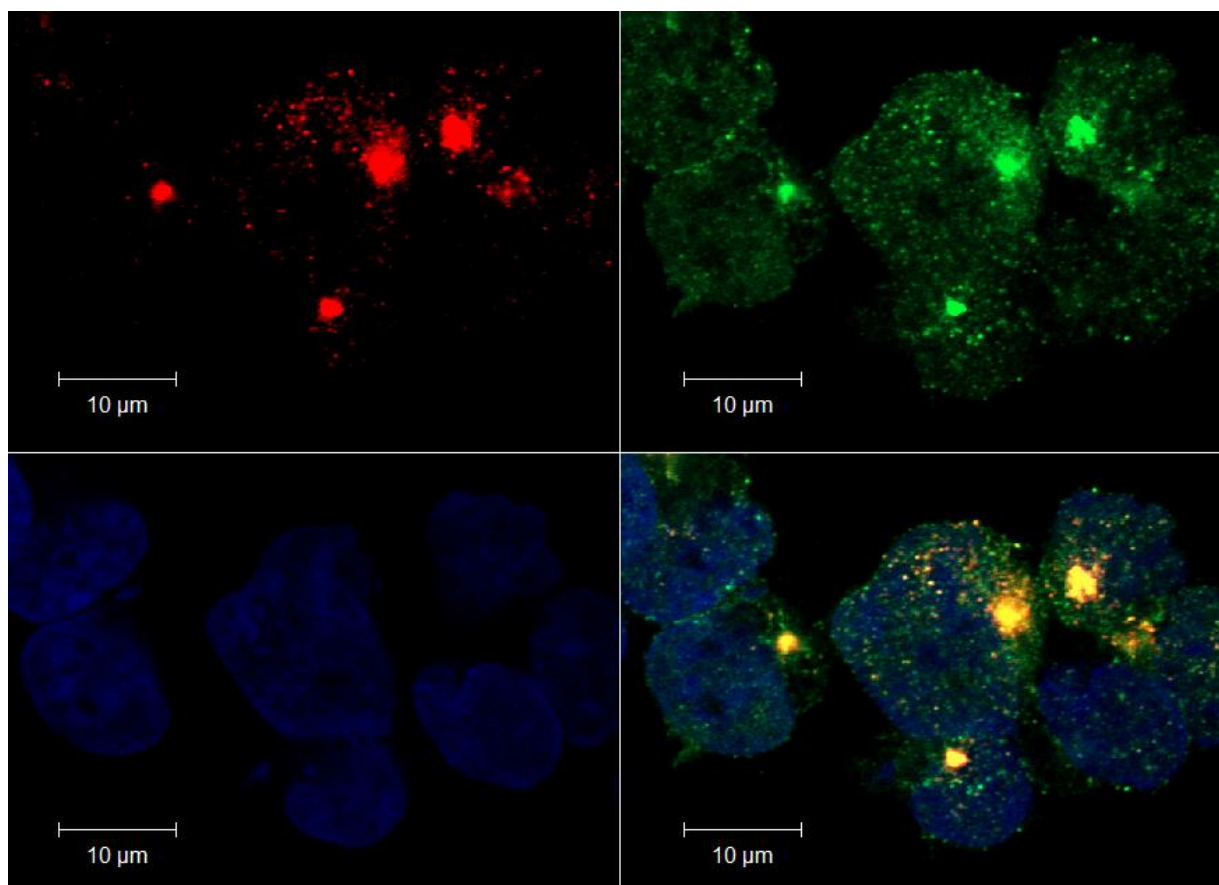


**Рис. 3.24.** Імунофлуоресцентний аналіз локалізації білка GLG1 (червоне) у клітинах K562. Комплекс Гольджі (зелене), ядра дофарбовані барвником DAPI (синє). Перекриття сигналів локалізації (жовте)

Колокалізацію білків Vcr-Abl/GLG1 у клітинах K562 вивчали за допомогою імунофлуоресцентного аналізу. Результати візуалізували шляхом конфокальної мікроскопії. Аналіз зображень показав перекриття сигналів локалізації онкобілка Vcr-Abl і білка GLG1 у комплексі Гольджі, що свідчить про наявність часткової колокалізацію між цільовими білками у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії. Візуально колокалізація білків Vcr-Abl/GLG1 проявляється появою жовтого кольору при накладанні зображень за допомогою програмного забезпечення LSM Browser (рис. 3.25).

Для визначення залежності пропорційного розподілу онкобілка Vcr-Abl і білка GLG1 у клітинах K562, ми використали коефіцієнт кореляції Пірсона (PCC). Встановлено, що PCC для Vcr-Abl/GLG1 становить 0,733, що свідчить

про високий рівень кореляції між цільових локалізацією білків. Пропорційний субклітинний розподіл досліджуваних білків є важливою умовою не тільки їх колокалізації, а й може бути свідченням про можливу участі у спільних білкових каскадах та взаємозалежній функціональній активності досліджуваних білків, а саме Vcr-Abl/GLG1 у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії.



**Рис. 3.25.** Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної локалізації білка GLG1 (червоне) і онкобілка Vcr-Abl (зелене) у клітинах K562. Ядра дофарбовані барвником DAPI (синє). Перекриття сигналів локалізації GLG1/Vcr-Abl (жовте)

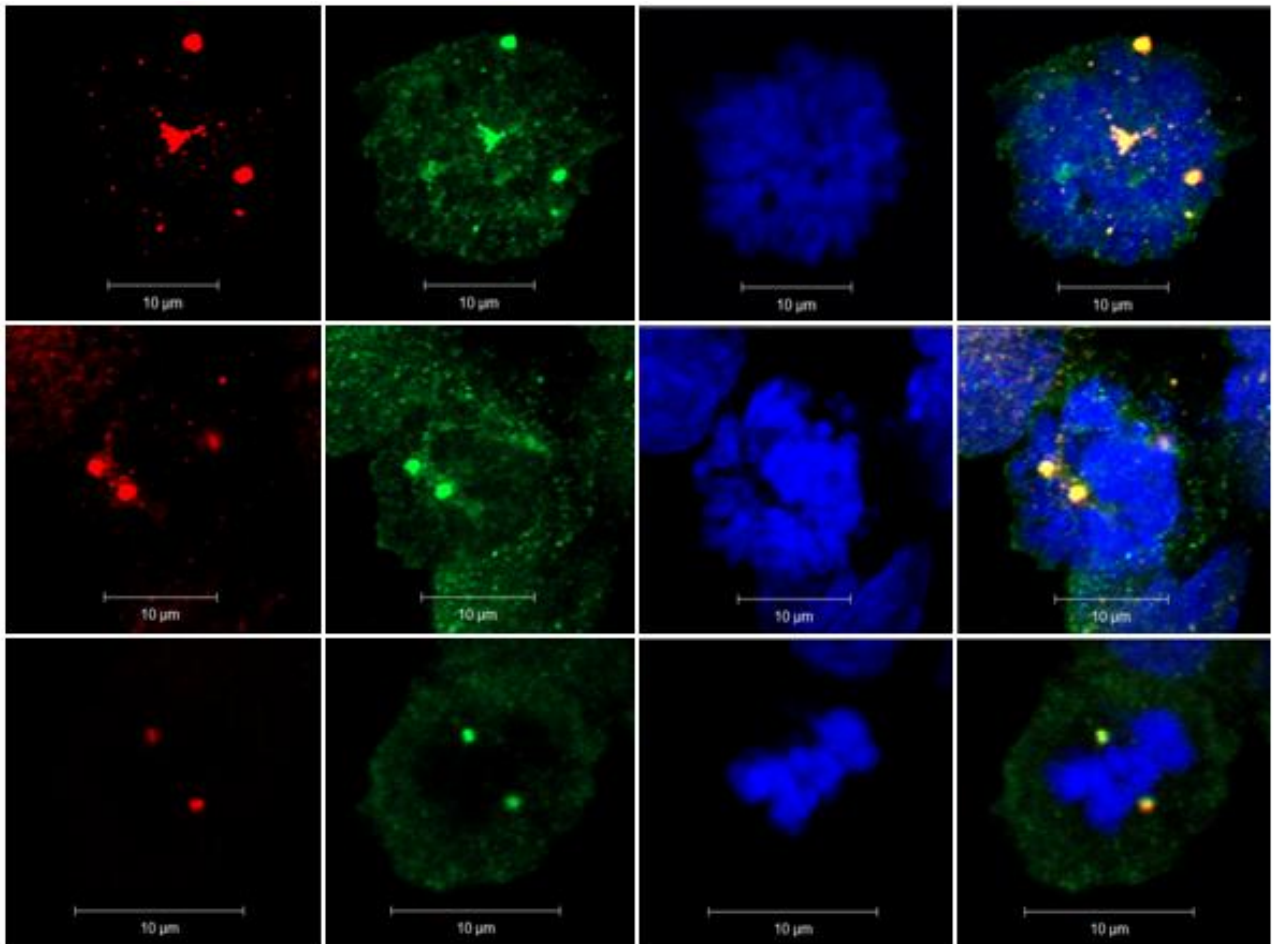
Показано, що коефіцієнт колокалізації Мандерса для білків Vcr-Abl/GLG1 склав для M1 – 0,992 (індекс, що показує перекриття сигналів локалізації GLG1 із сигналами локалізації Vcr-Abl), для M2 – 0,443 (індекс, що показує наскільки сигнали локалізації Vcr-Abl перекриваються із сигналами локалізації GLG1).

Отримані результати показують, що білок GLG1 майже повністю колокалізується із онкобілком Vcr-Abl. В той час як для Vcr-Abl характерна лише часткова колокалізація із білком GLG1 у комплексі Гольджі. Різниця у показниках між M1 і M2 пояснюється особливостями внутрішньоклітинної розподілу досліджуваних білків. Оскільки онкобілок Vcr-Abl лише частково локалізується у комплексі Гольджі, значна його частина зосереджена по всій цитоплазмі клітини та ядрі, що фізично унеможлиблює повне перекриття з білком GLG1, а отже його показник колокалізації для M2 значно менший за показник M1. Отже, отримані результати кількісно аналізу свідчать про високий рівень кореляції та колокалізації між білками Vcr-Abl/GLG1 у комплексі Гольджі клітин K562.

Ми вважаємо, що утворений білковий комплекс Vcr-Abl/GLG1 є досить стабільним протягом всього клітинного циклу, адже зафіксована під час інтерфази колокалізація онкобілка Vcr-Abl і білка GLG1 незмінно зберігається і під час поділу клітин K562 ( рис. 3.26.).

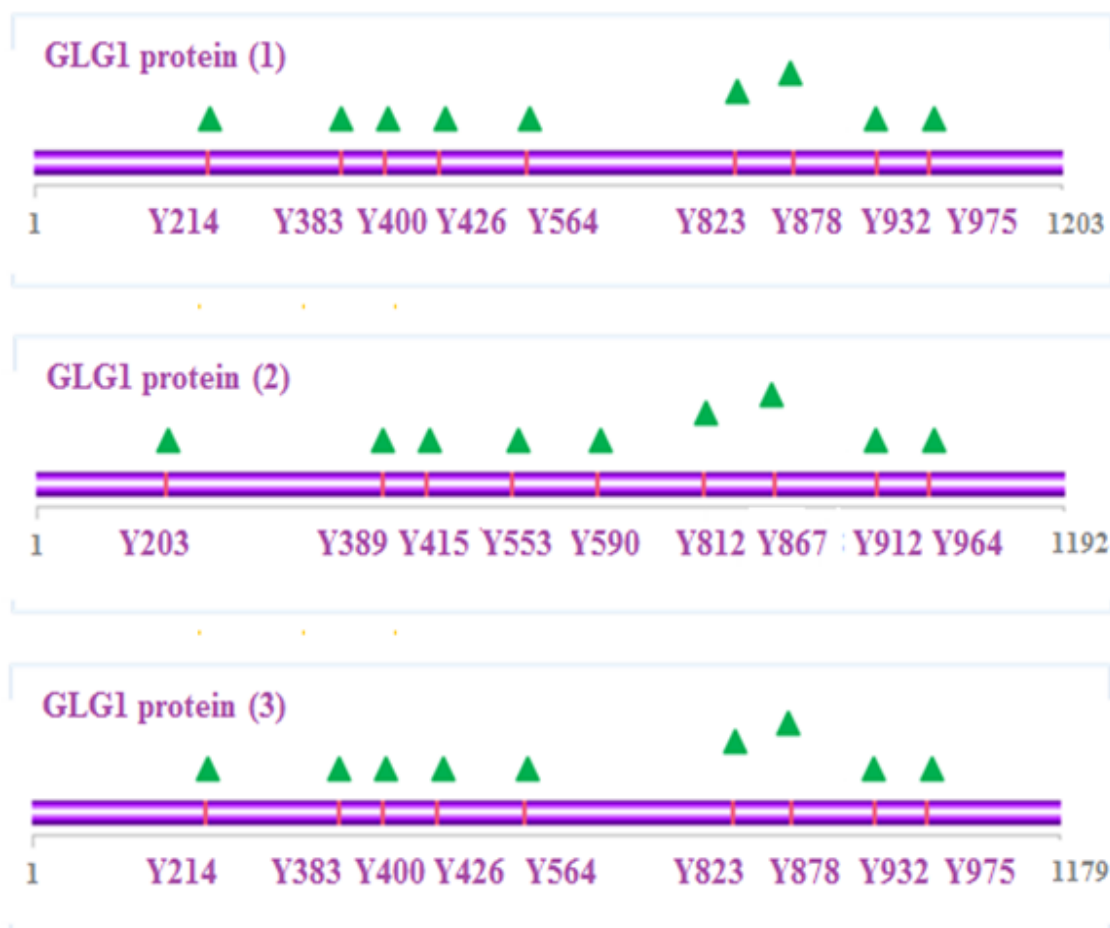
Таким чином, у даному підрозділі за допомогою імунофлуоресцентного аналізу з'ясували, що основним місцем локалізації білка GLG1 у клітинах K562 є комплекс Гольджі, що є характерною особливістю злоякісних клітин. Також вперше продемонстрували колокалізацію між онкобілком Vcr-Abl і білка GLG1 у комплексі Гольджі клітин хронічної мієлоїдної лейкемії та показали, що білковий комплекс Vcr-Abl/GLG1 є досить стійким оскільки зберігається не лише в період інтерфази, а й в період поділу клітин.

**3.4.3. Визначення фосфорильованих форм білка GLG1 у клітинах K562.** З метою визначення тирозинових сайтів на білкові GLG1, які можуть бути фосфорильовані під час білкової взаємодії з онкобілком Vcr-Abl, ми користувалися наступними програмними забезпеченнями: Disphos 1.3., KinasePhos та PhosphoPICK. Аналіз сайтів фосфорильовання здійснили для трьох ізоформ білка GLG1. Послідовність білка була отримана з баз даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації, США.



**Рис. 3.26.** Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної локалізації білка GLG1 (червоне) і онкобілка Vcr-Abl (зелене) у клітинах K562. Ядра дофарбовані барвником DAPI (синє). Перекриття сигналів локалізації білків GLG1/Vcr-Abl (жовте)

Таким чином, ми спрогнозували, що для ізоформ 1 та 3, найвищу імовірність фосфорилування мають Y823, Y878 сайти. Для ізоформи 2 – це Y812, Y867 сайти. Окрім зазначених вище сайтів, передбачено ще ряд послідовностей, які можуть бути фосфорильовані, хоча й з дещо нижчою імовірністю, а саме Y214, Y383, Y400, Y426, Y564, Y932, Y975 сайти для ізоформ 1 і 3, та Y203, Y389, Y415, Y553, Y590, Y912, Y964 сайти для ізоформи 2 (рис 3.27).

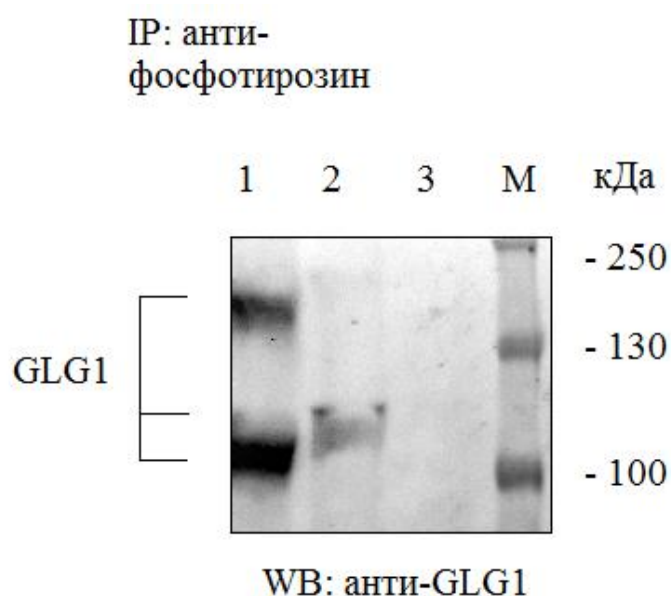


**Рис. 3.27.** Результати біонформатичного аналізу, передбачення Туг сайтів фосфорилування на лізоформах білка GLG1. Спрогнозовані за допомогою програмного забезпечення Disphos 1.3., KinasePhos, PhosphoPICK сайти фосфорилування на схемі позначені зеленими трикутниками, а також вказаний відповідний номер сайту. Сайти з найбільшою імовірністю фосфорилування за Туг, на схемі зображені вище інших сайтів

Для експериментального виявлення фосфорильованих форм GLG1, ми аналізували лізати клітин K562 шляхом ко-імунопреципітації. Преципітацію цільових білків здійснили за допомогою антитіл проти фосфотирозину. Отримані зразки розділяли шляхом електрофорезу у поліакриламідному гелі. Результати візуалізували за допомогою вестерн блот аналізу та антитіл проти GLG1 (рис. 3.28). Аналіз блотограми підтвердив наявність фосфорильованої форми білка GLG1 у клітинах K562. Як видно з отриманих результатів



фосфорильованою за тирозином у клітинах K562 є лише одна ізоформа білка GLG1. Цікаво, що нею є форма GLG1 з найменшою молекулярною масою, тобто саме та, що утворює білковий комплекс із Vcr-Abl. Це дає підстави вважати, що виявлена нами ізоформа білка GLG1, набуває фосфорильованого стану за рахунок взаємодії з онкобілком Vcr-Abl, який має високу тирозин кіназну активність. Неконтрольоване фосфорильовання білка GLG1 може вплинути на його функціональну активність та низхідні сигнальні шляхи, і як наслідок порушення таких клітинних процесів як рухливість, адгезія, міграція клітини, у яких безпосередньо задіяний даний білок.



**Рис. 3.28.** Преципітація ендогенних білків антитілами проти фосфотирозину: 1 – білок GLG1, лізати клітин K562, контроль; 2 – GLG1 результати преципітації; 3 – інкубація агарози лише з лізатами клітин K562; M – маркер молекулярних мас Plus Prestained 10-250kDa Protein Ladder (Thermo Scientifir), IP – імунопреципітація, WB – вестерн блот

Таким чином, ми експериментально виявили фосфорильовану за тирозином форму білка GLG1 у клітинах K562, що може бути наслідком його взаємодії із онкобілком Vcr-Abl. За допомогою біоінформатичного аналізу



спрогнозували, що найбільшу вірогідність фосфорилування для ізоформи 1 і 3 мають Y823, Y878 сайти та Y823, Y878 сайти для ізоформи 2.

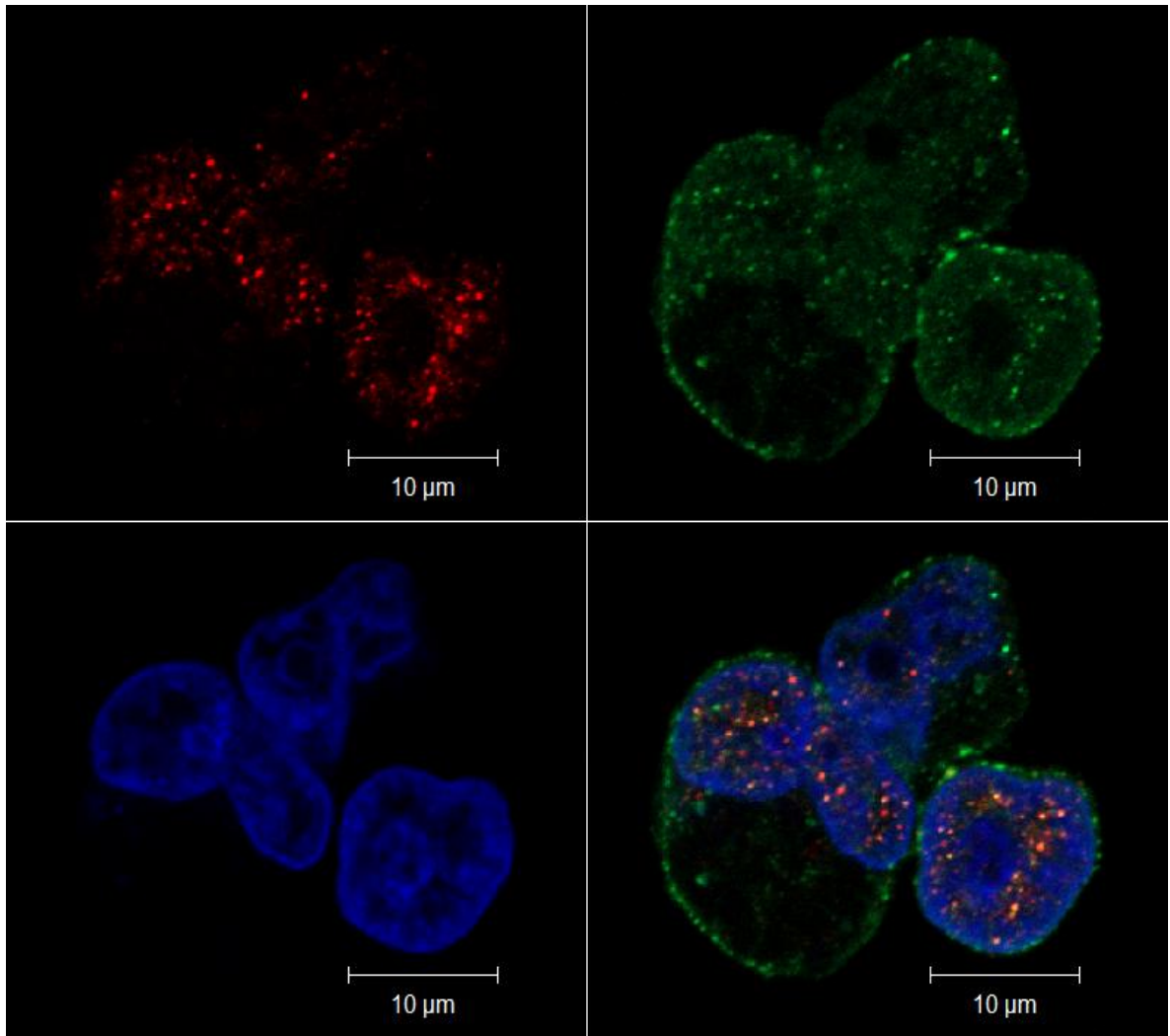
**Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

1. **Antonenko S**, Kravchuk I, Telegeev G. Bcr-Abl oncoprotein interacts with GLG1 in K562 cells: role in pathogenesis of chronic myeloid leukemia. Cytology and Genetics. 2020;54(1):62-70.

### 3.3. Білок ZNF217 як потенційний партнер онкобілка Bcr-Abl

**3.3.1. Колокалізація онкобілка Bcr-Abl і білка ZNF217 у клітинах K562.** Білок ZNF217 локалізується у ядрі клітини, це відомо з літератури та підтверджено у наших експериментах для клітин K562. Передумовою для вивчення колокалізації білком ZNF217 і онкобілком Bcr-Abl, були результати мас-спектрометричного аналізу попередньо отримані у відділі молекулярної генетики ІМБГ НАНУ, які визначають білок ZNF217 можливим кандидатом на взаємодію з тирозин кіназою [17]. Локалізацію цільових білків вивчали за допомогою імунофлуоресцентного аналізу з використанням антитіл проти ZNF217 і Bcr-Abl. Візуалізовані за допомогою конфокальної мікроскопії клітини аналізували за допомогою програмного забезпечення Zeiss LSM Image Browser. Таким чином, ми виявили перекриття сигналів локалізації білка ZNF217 і онкобілка Bcr-Abl у ядрі клітин K562 (рис. 3.29).

Наявність колокалізації цільових білків, підтверджено і шляхом кількісного аналізу результатів за допомогою програмного забезпечення Fiji ImageJ пагін JACoP. Позитивна кореляція між сигналами локалізації білка ZNF217 і онкобілка Bcr-Abl підтверджена показником коефіцієнту кореляції Пірсона, який склав 0,524 від максимально можливого – 1,00. Згідно показників коефіцієнту колокалізації Мандерса, M1 індекс перекриття сигналу локалізації ZNF217 з сигналами локалізації Bcr-Abl складає 0,721 від максимально можливого показника 1,00. Індекс перекриття M2, що показує наскільки сигнали локалізації Bcr-Abl перекриваються сигналами локалізації ZNF217, дещо нижчий – 0,226, проте очікуваний оскільки лише частина онкобілка Bcr-Abl мігрує до ядра клітини. Експериментальне підтвердження колокалізації білків Bcr-Abl/ZNF217 є необхідною умовою подальшого вивчення ролі ZNF217 в етіології розвитку хронічної мієлоїдної лейкемії. Дані про колокалізацію можуть свідчити про пряму чи опосередковану через білки адаптери взаємодію між Bcr-Abl/ZNF217, участь їх у спільних сигнальних каскадах, функціях тощо.



**Рис. 3.29.** Імунофлуоресцентний аналіз експресії білка ZNF217 у клітинах K562. Білок ZNF217 (червоне), онкобілок Vcr-Abl (зелене). Ядра дофарбовані барвником DAPI (В, синє). Перекриття сигналів локалізації (жовте)

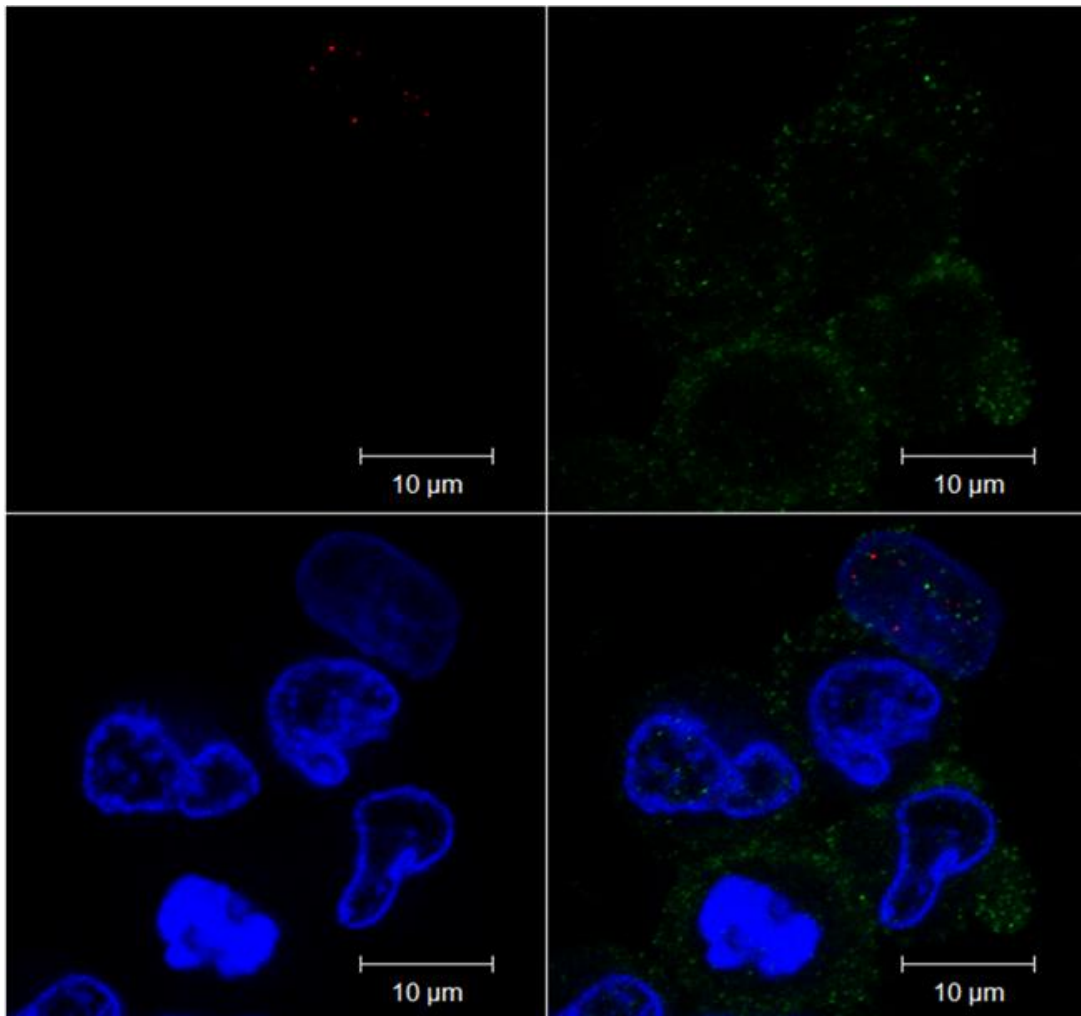
Отже, вперше виявлено колокалізацію між онкобілком Vcr-Abl і ZNF217 у клітинах K562. Ми вважаємо, колокалізація білків Vcr-Abl/ZNF217 відбувається під час їх прямої взаємодії в клітинах ХМЛ. Спираючись на дані про неконтрольовану тирозин кіназну активність Vcr-Abl, ми припускаємо, що він може фосфорилувати ZNF217 і таким чином викликати гіперактивацию його функцій та сприяти проліферації клітин.

**3.3.2. Вплив кіназної активності онкобілка Bcr-Abl на експресію білка ZNF217 у клітинах K562.** Неконтрольоване фосфорилування білкових партнерів є одним із головних наслідків функціонування онкобілка Bcr-Abl та етіологічною подією при ХМЛ. У своєму дослідженні тирозин кіназу активність Bcr-Abl інгібували за допомогою іматинібу, який є препаратом першої лінії при лікуванні хронічної мієлоїдної лейкемії людей. Клітини K562 культивували у середовищі RPMI з додаванням всіх необхідних речовин та 2,5 мМ іматинібу протягом 24 год. Після чого клітини вивчали шляхом імунофлуоресцентного аналізу з використанням антитіл проти Bcr-Abl з титром 1:200 і ZNF217 з титром 1:200. Аналіз результатів за допомогою конфокальної мікроскопії показав, що через 24 год. інкубації з іматинібом, у переважній більшості клітин відсутня експресія білка ZNF217 (рис.3.30.). При чому у таких клітинах, онкобілок Bcr-Abl локалізується майже виключно в цитоплазмі клітини. А у клітинах, у яких все ж зберігається експресія білка ZNF217, онкобілок Bcr-Abl мав чіткі сигнали локалізації не лише у цитоплазмі, а й ядрі клітини ХМЛ.

Ми вважаємо, що інгібування іматинібом кіназної активності Bcr-Abl є передумовою порушення ряду сигнальних каскадів і важливих клітинних процесів, які сприяють потраплянню онкобілка до ядра клітини. Зокрема процесу проліферації, оскільки вважається, що ядерна локалізація онкобілка Bcr-Abl може реалізуватися під час поділу клітин, який під впливом іматинібу майже зовсім припиняється.

Кількісний аналіз зображень клітин K562 після інкубації з іматинібом не виявив колокалізації між білками Bcr-Abl/ZNF217.

Отже, тирозин кіназна активність онкобілка Bcr-Abl є однією з основних умов експресії білка цинкового пальця 217 у клітинах K562. Ми припускаємо, що шляхом дерегуляції ZNF217, онкобілок Bcr-Abl може впливати на клітинні процеси (проліферацію, диференціації клітини, антиапоптичної відповіді, генетичної стабільності і т.д.), які є критичними при розвитку і прогресуванні онкопатогій, в тому числі і ХМЛ.



**Рис. 3.30.** Імунофлуоресцентний аналіз експресії білка ZNF217 у клітинах K562 після дії іматинібу: білок ZNF217 (червоне), онкобілка Vcr-Abl (зелене). Ядра дофарбовані барвником DAPI (В, синє). Перекриття сигналів локалізації (жовте)

Таким чином, вперше встановлено залежність між кіназною активністю онкобілка Vcr-Abl і експресії білка ZNF217 у клітинах K562. Гіперактивація функції білка ZNF217, під впливом Vcr-Abl може бути однією з причин неконтрольованого поділу і росту клітин, порушення генетичної стабільності та апоптозу при ХМЛ.

**Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

1. **Antonenko S**, Polishchuk Y, Telegeev G. ZNF217 protein expression in Bcr-Abl-positive chronic myeloid leukemia cells. XIV Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine; 2020 May 27-28, Kyiv, Ukraine.

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Злиті гени, які виникають у результаті хромосомних перебудов, є характерною особливістю численних онкопатологій. До них належить і хронічна мієлоїдна лейкемія, драйверним геном якої є гібридний онкоген *Bcr-Abl*, що утворюється у результаті реципрокної транслокації між 9 та 22 хромосомами [2-5,10]. Зазвичай, продукти синтезу злитих генів мають руйнуватися за рахунок механізмів контролю якості білків, проте онкобілок *Bcr-Abl* здатний уникати систем деградації білків і таким чином накопичуватися в клітині [15]. Крім того, онкобілок *Bcr-Abl* має високу неконтрольовану тирозин кіназну активність, що викликає порушення численних сигнальних зв'язків та трансформує такі важливі клітинні процеси як проліферація, диференціація та апоптоз гемопоетичних клітин [1,12,27-29]. Розуміння молекулярних механізмів перебудов, які відбуваються під впливом онкобілка *Bcr-Abl* є важливою складовою етапу розробки нових підходів діагностики та терапії. Оскільки, селективні інгібітори тирозин кінази, які є основною терапією при ХМЛ, не забезпечують бажаного успіху лікування, майже у третини пацієнтів розвивається стійкість до препарату за рахунок появи точкових мутацій на домені *Abl* [3,14,77]. Для подолання цієї проблеми, на противагу іматинібу, було створено препарати інгібітори тирозин кінази другого покоління (нілотиніб, дазатиніб). Про те, навіть успіх, препарату третього покоління (понатиніб), який дає можливість боротьби із найнебезпечнішою мутацією T315I, є тимчасовим, оскільки у літературі вже з'явилася інформація про появу нових точкових мутацій, які нівелюють ефективність інгібітору [83,84]. Тому на сьогодні існує потреба у розробці принципово нових підходів до лікування хронічної мієлоїдної лейкемії, які будуть не чутливими до мутаційної мінливості та сприятимуть зниженню рівня онкобілка *Bcr-Abl* в клітині, а не лише блокуватимуть його кіназну активність,

адже навіть після цього онкобілок може виступати в ролі субстрату для білкових взаємодій. Існує два альтернативні підходи для зниження рівня білка Vcr-Abl: інгібування біосинтезу та індукції деградації білка [198]. Для інгібування біосинтезу онкобілка Vcr-Abl був створений препарат омацетаксин, який діє шляхом зв'язування з аміноацил-тРНК сайтом рибосом. Однак він не був введений у загальну медичну практику при ХМЛ, оскільки, як виявилось, омацетаксин пригнічує синтез загального білка, що спричиняло погіршення самопочуття пацієнтів [15]. Більш перспективним видається підхід, який полягає у селективній деградації онкобілка Vcr-Abl. У літературі існують дані про інгібування білка теплового шоку 90 (HSP90), оскільки він є основним молекулярним шапероном ссавців, який забезпечує фолдинг цільових білків, їх дозрівання та блокує протеосомну деградацію. Однак при інгібуванні HSP90 спостерігалася низька селективність до онкобілка Vcr-Abl та висока токсичність препарату для клітини [17,199]. Нині триває пошук агентів, які будуть мати високу селективність до онкобілка Vcr-Abl та сприятимуть його деградації.

У дисертаційній роботі ми вперше виявили взаємодію онкобілка Vcr-Abl з деубіквітинуючим білком USP1. Слід відмітити, що у клітинах K562 зустрічаються всі три відомі ізоформи білка USP1, проте білковий комплекс з онкобілком Vcr-Abl утворюють лише дві із них. Результати імунофлюоресцентного аналізу підтвердили наявність колокалізації для онкобілка Vcr-Abl та білка USP1. Було з'ясовано, що утворення білкового комплексу Vcr-Abl/USP1 відбувається в ядрі клітини. Як зазначено у літературному огляді, білок USP1 належить до цистеїнових протеаз людини, які беруть участь різноманітних клітинних процесах, зокрема таких як відповідь на пошкодження ДНК, контроль клітинного циклу, проліферація, диференціація, апоптози [103-105]. За рахунок деубіквітинуючих властивостей білок USP1 запобігає деградації цільових білкових субстратів, що сприяє їх накопиченню та є передумовою для розвитку онкопатології [140]. Незважаючи на те, що в еукаріотичних клітинах існує дві системи деградації білків, лізосомна та протеосомна, близько 80% внутрішньоклітинних білків руйнуються за



допомогою 26S протеасоми. Серед них такі ключові білки клітини, як фактори транскрипції, ядерні рецептори, регулятори клітинного циклу (цикліни, циклін-залежні інгібітори), кінази, пухлинні супресори, а також білки з аномальними структурами, що виникають за рахунок мутацій або метаболічного ураження [200]. Для онкобілка Vcr-Abl теж характерна пострансляційна модифікація у вигляді убіквітинування, вона відбувається за рахунок його NH<sub>2</sub>-кінця (180-191 амінокислотні залишки) на частині Vcr [199]. Незбалансоване функціонування убіквітинуючих і деубіквітинуючих білків є причиною різних патологій клітини. Так, порушення у функціонуванні деубіквітинази USP1 корелює із розвитком мієломи, меланоми, саркоми, раку шийки матки та шлунка [130-132]. Тому експериментальне підтвердження взаємодії між онкобілком Vcr-Abl і білком USP1 є важливою передумовою для вивчення наслідків цієї взаємодії, оскільки білок USP1 за рахунок своїх деубіквітинуючих властивостей може сприяти накопиченню онкобілка Vcr-Abl в клітині та прогресуванню захворювання.

На наступному етапі дисертаційної роботи ми продовжили поглиблене вивчення білкового комплексу Vcr-Abl/USP1 та з'ясували, що онкобілок Vcr-Abl взаємодіє з білком USP1 за рахунок свого PH домену. Експериментальне підтвердження утворення білкового комплексу PH/USP1 здійснили за допомогою методу коімунопреципітації та пул-даун аналізу. Для визначення взаємодії білків PH і USP1, за допомогою методу ко-імунопреципітації, ми створили плазмідний вектор pCMV-NA-USP1, який ко-трансфікували з плазмідним вектором pEGFP-PH у клітини 293T, отримані результати візуалізували за допомогою вестерн блот аналізу. Для вивчення білкового комплексу PH/USP1 шляхом пул-даун аналізу, використали лізати клітин K562, які мають ендогенний білок USP1. Білок PH отримали шляхом експресії pET-28c-PH у клітинах E.coli, з подальшим очищенням шляхом афінної хроматографії. Таким чином, за допомогою двох потужних молекулярних методів ми підтвердили взаємодію домену PH онкобілка Vcr-Abl і білка USP1. Цікавим, є той факт, що на відміну від повнорозмірного онкобілка Vcr-Abl, з

яким взаємодіють лише дві ізоформи білка USP1, рекомбінантний РН домен може утворювати комплекс з усіма трьома ізоформами деубіквітинази, які характерні для клітин K562. Поясненням цьому можуть бути особливості третинної структури чи посттрансляційних модифікацій онкобілка Vcr-Abl, які унеможливають взаємодію з третьою ізоформою білка USP1. Як відомо з літератури, саме домен РН у тандемі із доменом ДН є єдиними структурними відмінностями між формами p210 та p190 онкобілка Vcr-Abl. Незважаючи на подібну активність тирозин кінази, форми p210 та p190, пов'язані з різними типами лейкемії та мають різну сигнальну мережу. До того ж, вважається, що домен РН, відіграє важливу роль у формуванні диференційованих сигнальних мереж p210, оскільки, мутації саме у РН домені, а не в домені ДН, впливають на клітинну локалізацію форми p210 та зменшують кількість взаємодій із селективними партнерами. Існують відмінності і в внутрішньоклітинній локалізації форм p190 і p210 онкобілка Vcr-Abl. Так форма p190 рівномірно локалізується по всій цитоплазмі клітини, в той час локалізація форми p210, окрім розподілу по цитоплазмі пов'язана з ядром та комплексом Гольджі [17]. З літератури відомо, що навіть невеликі відмінності в мікрооточенні двох форм Vcr-Abl призводять до різних взаємодій, визначають різні субстратні білки, що змінюють всю сигнальну мережу [9]. У своєму дослідженні ми показали, що переважна більшість рекомбінантного РН домену локалізується у ядрі клітини, хоча частково він присутній і в цитоплазмі клітини. Це дає підстави вважати, що домен РН може брати безпосередню участь у визначенні ядерної локалізації форми p210 онкобілка Vcr-Abl. Також за допомогою конфокальної мікроскопії ми детектували перекриття сигналів локалізації домену РН з білком USP1 в ядрі клітин 293Т. Для проведення даного експерименту, шляхом субклонування кодуєчої послідовності гена USP1 із рUC18-USP1 у вектор для еукаріотичної експресії рЕСFP-C3, ми створили генетичну конструкцію рЕСFP-C3-USP1. Отриманий плазмідний вектор рЕСFP-C3-USP1 ко-трансфікували із плазмідним вектором рmCitrineC1-РН у клітини 293Т та інкубували протягом 24 год., після чого вивчали за допомогою конфокальної мікроскопії. Розпізнавання білка

субстрату деубіквітиназами здійснюється шляхом селективного зв'язування з доменами цільових білків чи за допомогою білків адаптерів [200]. Ми з'ясували, що специфічність розпізнавання Vcr-Abl деубіквітиназою USP1 реалізується за рахунок взаємодії з PH доменом Vcr частини онкобілка. Таким чином, отримані результати поглиблюють розуміння ролі PH домену у формуванні сигнальних шляхів p210 Vcr-Abl та селективному зв'язуванні з білком USP1.

Фосфорилування є важливим регуляторним механізмом клітини, переважна більшість ферментів та рецепторів активуються/деактивуються за допомогою кіназ та фосфатаз. Пострансляційна модифікація у вигляді фосфорилування, характерна і для убіквітин-специфічних протеаз (USPs). Сигнальні шляхи, які дерегулюються за рахунок протеїнкіназ, майже завжди сприяють виникненню та прогресуванню різних видів раку [128,140]. Експериментальне підтвердження утворення білкового комплексу Vcr-Abl/USP1 стало передумовою для виявлення фосфорильованих форм білка USP1 у клітинах K562. Результати біоінформатичного аналізу підтвердили можливість фосфорилування білка USP1 за сайтами тирозину, згідно отриманих даних найбільшу імовірність фосфорилування мають Y504, Y678, Y681 тирозинові сайти. Щоб перевірити наше припущення, ми вивчили лізати клітин K562 за допомогою методу ко-імунопреципітації з використанням антитіл проти фосфотирозину. Шляхом вестерн блот аналізу ми візуалізували отримані результати та підтвердили наявність фосфорильованих форм білка USP1 за сайтом тирозину. Найбільш чітко на блотограмі проявилися дві ізоформи білка USP1, саме ті ізоформи, які утворюють білковий комплекс з онкобілком Vcr-Abl. Це дає підстави говорити, що фосфорильовані форми білка USP1 з'являються за рахунок взаємодії з онкобілком Vcr-Abl. Таким чином, пострансляційна модифікація білка USP1 у вигляді фосфорилування, може бути одним із наслідків утворення білкового комплексу Vcr-Abl/USP1. Неконтрольоване фосфорилування білка USP1 може бути причиною

дерегуляції його функціональних властивостей та порушенням балансу між процесами убіквітинування/деубіквітинування у клітинах K562.

У ракових клітинах існують механізми придушення деградації злитих онкобілків, основну роль у цьому процесі виконують деубіквітинуючі ферменти, які руйнують ізопептидні зв'язки між молекулами убіквітину чи убіквітином і білком субстратом [15,132]. Ідентифікація селективних деубіквітиназ є перспективною стратегією зниження рівня злитих онкобілків у клітині. Для визначення залежності між активністю деубіквітинуючого білка USP1 та рівнем онкобілка Vcr-Abl і його локалізацією використали сполуку ML323, що є потужним селективним інгібітором білкового комплексу USP1/UAF1. Слід нагадати, що взаємодія деубіквітинази USP1 з кофактором UAF1 є одним із механізмів регуляції його функціональних властивостей. Ми інкубували клітини K562 із ML323 протягом 24 год., моніторинг колокалізації білків Vcr-Abl/USP1 та рівня онкобілка Vcr-Abl здійснили на 1,5 год., 3 год., 6 год, 12 год. і 24 год. Таким чином, за допомогою імунофлуоресцентного аналізу ми встановили, що під впливом інгібітору ML323, білок USP1 змінює характерну для нього ядерну локалізацію на цитоплазматичну. Перші зміни стають помітні уже після перших годин інкубації з інгібітором ML323. Аналізуючи літературні джерела, ми з'ясували, що детектовані нами зміни можуть відбуватися за рахунок порушення утворення білкового комплексу USP1/UAF1, оскільки деякі дослідники вважають, що саме кофактор UAF1 забезпечує націлення білка USP1 на його ядерні субстрати [104]. У перші три години інкубації з інгібітором ML323 значно знижується і відсоток колокалізації білків Vcr-Abl/USP1. Через 6 год. інкубації майже всі сигнали колокалізації білків Vcr-Abl/USP1 фіксуються у цитоплазмі клітини. На 12-24 год. інкубації з інгібітором ML323 відновлюються високі показники колокалізації онкобілка Vcr-Abl і білка USP1, при цьому зберігається їх цитоплазматична локалізація.

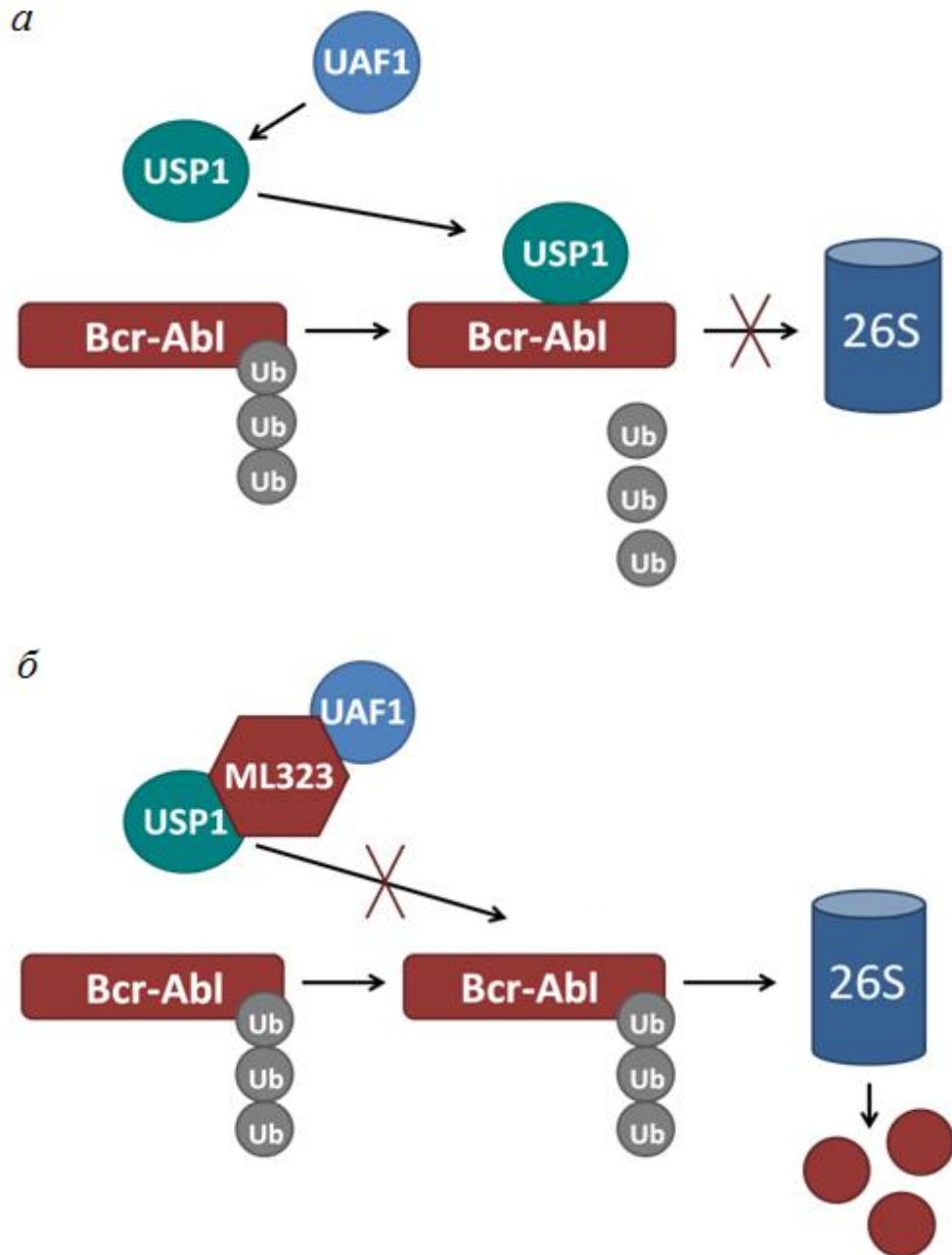
Слід наголосити, що деубіквітинуючі ферменти, здатні не лише регулювати убіквітин залежну деградацію білків, а й шляхом зміни типу

убіквітинування здатні регулювати локалізацію білків, участь у сигнальних шляхах, клітинних процесах тощо [121,202]. Так, наприклад, зміна локалізації білка відбувається, коли під впливом деубіквітинази, він переходить із полі- чи мультиубіквітинованого стану на моноубіквітинований. Враховуючи складну просторову організацію та динаміку сигнальних комплексів у клітинах ссавців, навіть невеликі відмінності в локалізації білків можуть мати значні наслідки на їх сигналінг [201]. Окрім локалізації, моноубіквітинування впливає на активацію білка, автофагію та ендоцитоз, важливе при репарації ДНК, експресії генів, динаміці хроматину, мембранному транспорті [202]. Моноубіквітинування зазвичай замало для того, щоб білок був зруйнований у протеосомі, але може бути сигналом для протеолізу в лізосомах. Поліубіквітинування по Lys 6, 27, 33, 63 необхідне при регуляції репарації ДНК, Lys 11 – при регуляції клітинного циклу, а Lys 63 – впливає на сигналінг. Сигналом же для протеосомної деградації є поліубіквітинування Lys 6, 11, 27, 29, 33, 48, серед яких головною міткою вважається полі- Lys 48. Поліубіквітинування по Lys 63 пов'язане із регуляцією активації кіназ, передачею клітинних сигналів, репарацією ДНК, ендоцитозом, лізосомною і протеосомною деградацією [203]. Таким чином, деубіквітинази мають широкий спектр впливу на свої білкові субстрати, дерегуляції їхніх функцій може стати передумовою для розвитку онкопатологій.

Для визначення залежності між активністю деубіквітинази USP1 та рівнем онкобілка Vcr-Abl, ми вивчали лізати K562 після 1,5 год., 3 год., 6 год, 12 год. і 24 год. інкубації з інгібітором МЛ323. Аналіз результатів за допомогою методу вестерн блот з використанням антитіл проти Vcr-Abl, показав зниження рівня онкобілка після інгібування деубіквітинази USP1. Перші зміни були зафіксовані уже після перших годин інкубації з МЛ323, найнижчі показники рівня онкобілка Vcr-Abl отримали через 3 години після інгібування активності білка USP1, так в середньому кількість онкобілка знизилася на 65-67% у порівнянні з контролем. Таким чином, отримані

результати свідчать про вплив білка USP1 на рівень онкобілка Vcr-Abl у клітинах K562. Слід відмітити, що зниження рівня онкобілка Vcr-Abl корелював із низьким рівня колокалізації білків USP1/Vcr-Abl. На 6 годину експерименту рівень онкобілка Vcr-Abl починає зростати і до 12-24 год. досягає показників контрольного варіанту. Враховуючи алостеричні властивості інгібітору ML323 ми припускаємо, що відновлення початкового рівня онкобілка Vcr-Abl може бути пов'язано із зниженням активності інгібітору. Крім того, активність каталітичних доменів білка USP1 може відновлюватися за рахунок інших незалежних від білка UAF1 чинників, одним з яких є його фосфорилування. Опираючись на наші дані, які свідчать про активне фосфорилування білка USP1 і клітинах K562, ми припускаємо, що після зниження активності ML323, тирозин-кіназна активність онкобілка Vcr-Abl може бути додатковим фактором активації білка USP1. При цьому деубіквітіназа USP1 продовжує зберігати свою цитоплазматичну локалізацію, оскільки сайт зв'язування з білком UAF1, який визначає його ядерну локалізацію, заблокований за допомогою інгібітору ML323. Ще одним поясненням зростання кількості онкобілка Vcr-Abl після 6 год. інкубації з ML323 може бути протеосомне перевантаження, викликане нездатністю переробляти аномально велику кількість неправильно складеного білка. Таке явище часто спостерігається при нейродегенеративних захворюваннях, при онкопатологіях це явище вивчено недостатньо, хоча відомо, що злоякісно трансформовані клітини мають підвищену швидкість синтезу білків і значне накопичення неправильно складених білків.

Ми вважаємо, що уникнення клітинного протеолізу онкобілком Vcr-Abl відбувається за участі деубіквітінази USP1 (рис. 4.1), адже інгібування білкового комплексу USP1/UAF1, за допомогою ML323, корелює із зниженим рівнем онкобілка Vcr-Abl, що може пояснюватися його руйнуванням за допомогою 26S протеосомної системи деградації клітини.



**Рис 4.1.** Топологія білкової взаємодії онкобілка Bcr-Abl і білка USP1 у K562, клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії людини: *a* – функціональні властивості білка USP1 активується за допомогою кофактора UAF1, білок USP1 взаємодіє з онкобілком Bcr-Abl та деубіквітує його, таким чином онкобілок Bcr-Abl уникає протеосомної деградації та накопичується в клітині, що сприяє прогресуванню захворювання; *б* – селективний білковий інгібітор ML323 блокує деубіквітинуючу активність білка USP1, убіквітинований онкобілок Bcr-Abl руйнується за рахунок протеосомної системи деградації

Таким чином, зниження рівня Vcr-Abl за рахунок клітинних систем деградації є новим перспективним напрям терапії ХМЛ, який незалежить від мутаційної активності доменів Abl кінази. Участь білка USP1 у процесах, які дерегулюються при онкопатологіях та його здатність впливати на рівень онкобілка Vcr-Abl у клітинах K562, робить деубіквітиназу USP1 перспективною терапевтичною мішенню при лікуванні Ph-позитивної хронічної мієлоїдної лейкемії.

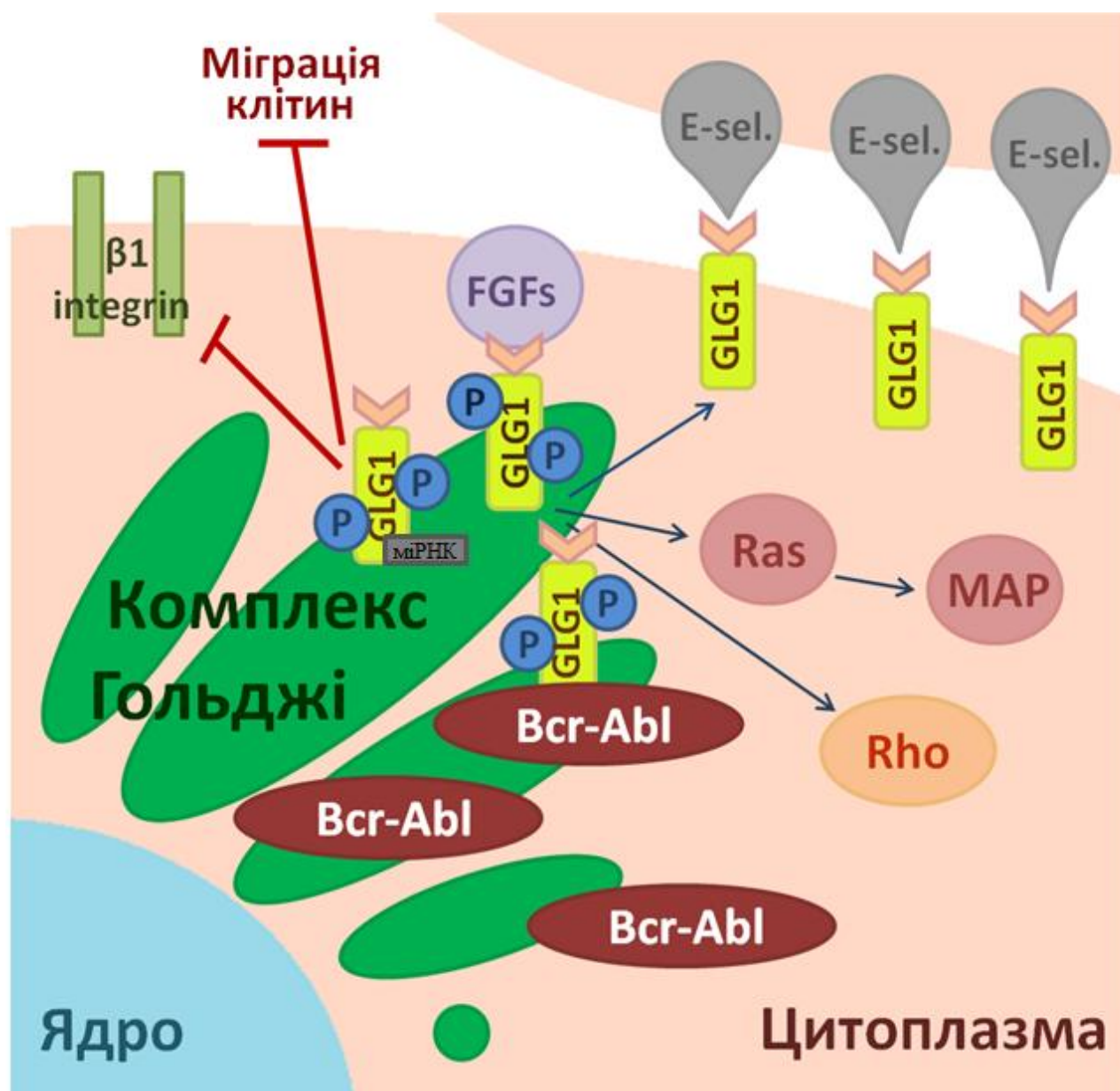
У наступному підрозділі дисертаційної роботи ми вперше виявили взаємодію онкобілка Vcr-Abl із білком GLG1. У клітинах K562 білок GLG1 представлений трьома ізоформами, це відомо з літератури та підтверджено в наших дослідженнях. Ми з'ясували, що онкобілок Vcr-Abl взаємодіє лише з однією із трьох відомих ізоформ білка GLG1. Наступний етап роботи полягав у визначенні місця утворення білкового комплексу Vcr-Abl/GLG1. Вважається, локалізація білка GLG1 корелює залежно від типу клітин, так він може зустрічатися на мембрані чи комплексі Гольджі [166]. Білок GLG1 належить до трансмембранних білків, локалізуючись на мембрані клітини він виконує роль ліганду до E-селектину, виступає в якості рецептора для декількох членів сімейства факторів росту фібробластів (FGF) тощо [164-167]. За допомогою імунофлуоресцентного аналізу, ми встановили, що у клітинах K562 білок GLG1 знаходиться у комплексі Гольджі, що є характерною ознакою злоякісно трансформованих клітин. Нині остаточно не з'ясовано, які саме функції він виконує у комплексі Гольджі. Припускається, що окрім функцій ліганду, у комплексі Гольджі білок GLG1 може виступати в ролі шаперону, зокрема для факторів росту фібробластів [166]. Про важливість його участі у функціонуванні комплексу Гольджі свідчить той факт, що інгібування білка GLG1 змінює архітектуру даного компартмента [162]. Ми показали, що комплекс Гольджі є місцем колокалізації білка GLG1 з онкобілком Vcr-Abl. Утворення білкового комплексу Vcr-Abl/GLG1 є передумовою вважати, що білок GLG1 може бути дерегульованим за рахунок тирозин кіназної активності онкобілка Vcr-Abl.



Шляхом біоінформатичного аналізу ми спрогнозували тирозинові сайти фосфорилування на GLG1. Так, для ізоформи 1 і 3, найбільшу вірогідність фосфорилування мають сайти Y823, Y878, а для ізоформи 2 – Y812, Y867. Для експериментального підтвердження наявності фосфорильованих за тирозином форм білка GLG1 у клітинах K562 ми використали метод ко-імунопреципітації з використанням антитіл проти фосфотирозину. Отримані зразки розділили у поліакриламідному гелі та візуалізували за допомогою вестерн блот аналізу. Таким чином, показали наявність фосфорильованої за тирозином форми білка GLG1 у клітинах K562. Цікаво, що фосфорильованою була ізоформа білка GLG1 з найменшою молекулярною масою, тобто саме та ізоформа, яка взаємодіє з онкобілком Bcr-Abl. Вважається, що білок GLG1 займає привілейоване положення у секреторних шляхах клітини (рис. 4.2), серед яких найбільш вивченими його участь у активації Ras-MAP кіназного каскаду, білків родини Rho, взаємодія з E-селектином, факторами росту фібробластів, тощо. Суперекспресія білка GLG1 сприяє метастазуванню клітин за рахунок гіперактивації каскаду Ras-MAP кіназ та білків сімейства Rho, що є передумовою метастазування клітин [164,167]. В той час як інгібування білка GLG1 за допомогою siRNA корелює із зниження рівня інтегрину  $\beta 1$  у клітинах, впливає на його інтерналізацію/рециклінг та інгібує міграцію переважної більшості ракових клітин. Вважається, що GLG1 може впливати на міграцію пухлинних клітин шляхом взаємодії на рівні комплексу Гольджі [165]. Можливо саме утворення білкового комплексу Bcr-Abl/GLG1 в апараті Гольджі стає причиною порушення критичних сигнальних шляхів та має трансформуючу роль на такі процеси як рухливість, адгезія, міграція клітин.

Таким чином, ми вважаємо, що онкобілок Bcr-Abl під час взаємодії з білком GLG1 у комплексі Гольджі, шляхом фосфорилування дерегулює його властивості, що викликає порушення низхідних сигнальних шляхів та створює передумови для метастазування Ph-позитивних клітин при ХМЛ.

Дерегуляція функціональної активності ZNF217 пов'язана із найбільш фундаментальними ознаками ракових клітин, а саме здатністю підтримувати



**Рис. 4.2.** Схема сигнальних шляхів у яких бере участь GLG1 та можлива роль онкобілка Bcr-Abl їх дерегуляції.

високий рівень проліферації, нечутливість до супресорів росту, нестабільність, мутації геному, порушення диференціювання клітин та антипроліферативної сигналізації [175-179]. Зміни в активності функціонування ZNF217 зафіксовані при раку молочної залози, яєчника, простати тощо [181,182,185,189]. Про участь ZNF217 у розвитку лейкемії на сьогодні не відомо, проте, результати мас спектрометричного аналізу [36], визначили його одним із потенційних

кандидатів на взаємодію з онкобілком Vcr-Abl, та створили передумови для вивчення його участі при ХМЛ.

Ми встановили, що у клітинах K562 білок ZNF217 локалізується виключно в ядрі. Колокалізацію білків Vcr-Abl/ ZNF217 вивчали шляхом імунофлуоресцентного аналізу з використанням специфічних антитіл проти цільових білків. Аналіз зображень за допомогою конфокальної мікроскопії показав наявність «злитих» сигналів локалізації для онкобілка Vcr-Abl та ZNF217. Як і очікувалося, колокалізація білків Vcr-Abl/ZNF217 була детектована в ядрі клітини. Літературні джерела свідчать, що близько 80% білків цинкового пальця регулюються шляхом фосфорилування, білок ZNF217 не є виключенням. Механізм фосфорилування білка ZNF217 є високо координованим процесом, його порушення впливає на регуляцію контактів між білком ZNF217 і молекулами ДНК під час мітозу, впливає на диференціювання, розвиток органів і тканин, тому дерегуляція цих процесів створює передумови для онкогенезу [175]. Для визначення залежності між активністю онкобілка Vcr-Abl і функціонуванням білка ZNF217 ми інкубували клітини K562 із іматинібом, який є відомим інгібітором тирозин кінази. Після цього клітини вивчали за допомогою імунофлуоресцентного аналізу та конфокальної мікроскопії. Аналіз отриманих результатів показав, що інгібування кіназної активності онкобілка Vcr-Abl супроводжується зниженням чи повною відсутністю експресії білка ZNF217 у клітинах K562. Разом з тим помітні зміни і у локалізації самої тирозин кінази, так у клітинах із порушеною експресією ZNF217, онкобілок Vcr-Abl зустрічається майже виключно у цитоплазмі. В той час як у контрольному варіанті та у клітинах, які зберегли високий рівень експресії білка ZNF217, онкобілок Vcr-Abl локалізується у цитоплазмі і ядрі. Можливо одним із основних шляхів потрапляння онкобілка Vcr-Abl у ядро є клітинний поділ. Під впливом іматинібуну рівень проліферації клітин суттєво знижується, що може стати причиною зміни субклітинної локалізації онкобілка Vcr-Abl. Отже, ми виявили кореляцію між тирозин кіназною активністю онкобілка Vcr-Abl і експресією білка ZNF217, та зафіксували зміни в локалізації

злитого онкобілка. Ми вважаємо, що білок ZNF217 може бути одним із тих білків-партнерів, завдяки якому онкобілок Bcr-Abl порушує проліферацію, диференціювання антипроліферативну сигналізацію клітин тощо. Незважаючи на те, що білок ZNF217 є уже визнаним онкодрайвером при декількох онкопатологіях [175], аналіз літературних джерел не виявив прямого інгібітору для даного білка, що створює певні труднощі при дослідженні його функціональних властивостей та вказує на необхідність його розробки. Таким чином, спираючись на літературні дані та отримані результати, ми визначаємо білок ZNF217 перспективною терапевтичною мішенню при терапії Ph-позитивної хронічної мієлодної лейкемії.

Отже, виявлені та охарактеризовані у дисертаційній роботі білкові комплекси Bcr-Abl/USP1, Bcr-Abl/GLG1, Bcr-Abl/ZNF217 поглиблюють розуміння сигнальних шляхів, які можуть бути включені у розвиток та прогресування Ph-позитивної хронічної мієлодної лейкемії, а також створюють передумови для розробки нових альтернативних методів терапії, стійких проти мутаційної мінливості онкобілка та здатних забезпечувати селективну деградацію гібридного онкобілка Bcr-Abl, а не лише пригнічувати з його кіназну активність.

## ВИСНОВКИ

Вивчення взаємодії онкобілка *Bcr-Abl* із білками-партнерами у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії людини дозволяє поглибити знання про зміни сигнальних шляхів під впливом тирозинкіназної активності *Bcr-Abl*, що буде сприяти розумінню етіології ХМЛ для розробки додаткової стратегії терапії ХМЛ шляхом модулювання рівня *Bcr-Abl* у клітині. У роботі встановлено та охарактеризовано нові взаємодії онкобілка *Bcr-Abl* із білками *USP1*, *GLG1* та *ZFP217* у Ph-позитивних клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії людини.

1. Клоновано кодуєчу послідовність гена *USP1* у вектори для еукаріотичної експресії та отримано цільові рекомбінантні білки.
2. Адаптовано метод імунофлуоресцентного аналізу для вивчення субклітинної локалізації і колокалізації білків у суспензійних клітинах K562.
3. Ідентифіковано взаємодію онкобілка *Bcr-Abl* із фосфорильованими за сайтами тирозину ізоформами *USP1* у клітинах K562, встановлено, що утворення білкового комплексу *Bcr-Abl/USP1* відбувається в ядрі клітин.
4. Шляхом коімунопреципітації та пул-даун аналізу з'ясовано, що онкобілок *Bcr-Abl* взаємодіє із *USP1* за допомогою домену PH.
5. Встановлено, що інгібування активності деубіквітинази *USP1* впливає на рівня онкобілка *Bcr-Abl* у клітинах K562 та запропоновано гіпотетичну модель убіквітин-протеосомної деградації онкобілка *Bcr-Abl* при ХМЛ.
6. Виявлено взаємодію онкобілка *Bcr-Abl* і *GLG1* у комплексі Гольджі клітин ХМЛ, показано, що ізоформа білка *GLG1*, яка утворює комплекс з онкобілком *Bcr-Abl* є фосфорильованою за сайтами тирозину.
7. Продемонстровано ядерну колокалізацію онкобілка *Bcr-Abl* і білка *ZFP217* та встановлено, що інгібування тирозин кіназної активності

Vcr-Abl корелює з низькою чи повною відсутністю експресії білка ZFP217 у клітинах K562.

8. Обґрунтовано можливість нових підходів до застосування отриманих результатів для розробки нової стратегії терапії ХМЛ шляхом модулювання рівня Vcr-Abl у клітині.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Flis S, Chojnacki T. Chronic myelogenous leukemia, a still unsolved problem: pitfalls and new therapeutic possibilities. *Drug Design, Development and Therapy*. 2019;13:825-843.
2. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009;113:1619-1630.
3. Soverini S, Mancini M, Bavaro L, Cavo M, Martinelli G. Chronic myeloid leukemia: the paradigm of targeting oncogenic tyrosine kinase signaling and counteracting resistance for successful cancer therapy. *Mol Cancer*. 2018;17:49.
4. Zhang H, Li S. Molecular mechanisms for survival regulation of chronic myeloid leukemia stem cells, *Protein Cell*. 2013;4(3)186–196, 2013.
5. Hamad A, Sahli Z, Sabban M, Mouteirik M, Nasr R. Emerging Therapeutic Strategies for Targeting Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells *Stem Cells, International*. 2013;2013(5405):724360.
6. Allart-Vorelli P, Porro B, Baguet F, Michel A, Cousson-Gelie F. Haematological cancer and quality of life: a systematic literature review. *Blood Cancer J*. 2015;5:e305.
7. Sattler M, Griffin JD. Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene. *Semin Hematol*. 2003;40:4–10.
8. Reckel S, Hamelin R, Georgeon S. Differential signaling networks of Bcr–Abl p210 and p190 kinases in leukemia cells defined by functional proteomics. *Leukemia*. 2017;31:1502–1512.
9. Reckel S, Gehin C, Tardivon D. Structural and functional dissection of the DH and PH domains of oncogenic Bcr-Abl tyrosine kinase. *Nat Commun*. 2017;8:2101.
10. Hai A, Kizilbash N, Zaidi S, et al. Differences in structural elements of Bcr-Abl oncoprotein isoforms in Chronic Myelogenous Leukemia. *Bioinformatics*. 2014;10(3):108–114.
11. Shet A, Jahagirdar B, Verfaillie C. Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Leukemia*. 2002;16:1402–1411(2002).

12. Aladag E, Haznedaroğlu I. Current perspectives for the treatment of chronic myeloid leukemia. *Turc J Med Sci.* 2019;49(1):1-10.
13. Flis S, Chojnacki T. Chronic myelogenous leukemia, a still unsolved problem: pitfalls and new therapeutic possibilities. *Drug Design Development and Therapy.* 2019;13:825-843.
14. Jabbour E, Cortes J, Kantarjian H. Tyrosine kinase inhibition: A therapeutic target for the management of chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2013 Dec;13(12):1433–1452.
15. Shibata N, Ohoka N, Tsuji G, Demizu Y, Miyawaza K, Ui-Tei R et al. Deubiquitylase USP25 prevents degradation of BCR-ABL protein and ensures proliferation of Ph-positive leukemia cells. *Oncogene.* 2020;1476:5594.
16. Shibata N, Miyamoto N, Nagai K, et al. Development of protein degradation inducers of oncogenic BCR-ABL protein by conjugation of ABL kinase inhibitors and IAP ligands. *Cancer Sci.* 2017; 108(8): 22:44:23Z.
17. Miroshnychenko D, Dubrovskaya A, Maliuta S, Telegeev G, Aspenström P. Novel role of pleckstrin homology domain of the Bcr-Abl protein: Analysis of protein–protein and protein–lipid interactions. *Exp Cell Res.* 2010;316(4): 530-542.
18. Bartram C.R, de Klein A, Hagemeijer A, van Agthoven, Geurts K, Bootsma D, et al. Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature.* 1983;306: 5940:277-280.
19. Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Jorge Cortes J. Flying under the radar: the new wave of BCR–ABL inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2007;6:834–848.
20. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram C.R, Grosveld G. Philadelphia chromosome are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell.* 1984;36:1:93-99.
21. Weerkamp F, Dekking E, Ng YY, van der Velden VH, Wai H, Böttcher S, Brüggemann M, et al. Flow cytometric immunobead assay for the detection of BCR-ABL fusion proteins in leukemia patients. *Leukemia.* 2009;Jun;23(6):1106-17.



22. Salem A, Loghavi S, Tang G, Huh YO, Jabbour EJ, Kantarjian H, et al. Myeloid neoplasms with concurrent BCR-ABL1 and CFBF rearrangements: A series of 10 cases of a clinically aggressive neoplasm. *Am J Hematol*. 2017;92(6):520–528.
23. Järås M, Johnels P, Agerstam H, Lassen C, Rissler M, Edén P, et al. Expression of P190 and P210 BCR/ABL1 in normal human CD34(+) cells induces similar gene expression profiles and results in a STAT5-dependent expansion of the erythroid lineage. *Experimental hematology*. 2009;37(3): 367-75.
24. Cutler JA, Tahir R, Sreenivasamurthy SK, Mitchell C, Renuse S, Nirujogi RS, et al. Patil Differential signaling through p190 and p210 BCR-ABL fusion proteins revealed by interactome and phosphoproteome analysis. *Leukemia*. 2017;31:1513–1524.
25. Soverini S, de Benedittis C, Mancini M, Martinelli G. Mutations in the BCR-ABL1 kinase domain and elsewhere in chronic myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015;15(Suppl):120–S128.
26. Roman G., Parziale A, Gottardi E, de Micheli D, Cillony, Tiribelli M et al. Novel type of Bcr-Abl transcript in a chronic myelogenous leukemia patient relapsed after bone marrow transplantation. *Br.J.Haematol*. 2000;111:2:644-646.
27. Mahon FX. Treatment-free remission in CML: who, how, and why? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2017;2017:102–109.
28. Chereda B, Melo JV. Natural course and biology of CML. *Ann Hematol*. 2015;94(Suppl 2):107–S121.
29. Colicelli, J. ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity. *Sci Signal*. 2010;14(3):139–141.
30. Nagar B, Hantschel O, Seeliger M, et al. Organization of the SH3-SH2 unit in active and inactive forms of the c-Abl tyrosine kinase. *Mol Cell*. 2006;21:787-98.
31. Hantschel O. Structure, Regulation, Signaling, and Targeting of Abl Kinases in Cancer. *Genes Cancer*. 2012 May;3(5-6):436–446.
32. Kang Z, Liu Y, Xu L, Long Z, Huang D, Yang Y. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer*. 2016;35:48.

33. Peiris M, Li F, Donoghue D. BCR: a promiscuous fusion partner in hematopoietic disorders *Oncotarget*. 2019 Apr 12;10(28):2738–2754.
34. Chen Y, Peng C, Li D, Li S. Molecular and cellular bases of chronic myeloid leukemia, *Protein and Cell*. 2010; 1:2:124–132.
35. Zhu H, Gao F. Regulatory Molecules and Corresponding Processes of BCR-ABL Protein Degradation. *J Cancer*. 2019;10(11): 2488
36. Lenoir M, Kufareva I, Abagyan R, Overduin M. Membrane and Protein Interactions of the Pleckstrin Homology Domain Superfamily. *Membranes (Basel)*. 2015; Dec;5(4):646–663.
37. Hoffman G, Cerione A. Signaling to the Rho GTPases: networking with the DH domain. *FEBS*. 2002; 513, 85–91.
38. Demehri S, O'Hare T, Eide CA, Smith CA, Tyner JW, Druker BJ, Deininger MW. The function of the pleckstrin homology domain in BCR–ABL-mediated leukemogenesis. *Leukemia*. 2010;24:226–229.
39. Rossman L, Worthylake D, Snyder J, Siderovski D, Campbell S, Sondek J. A crystallographic view of interactions between Dbs and Cdc42: PH domain-assisted guanine nucleotide exchange. *EMBO J*. 2002; 21:1315–1326.
40. Vonkova I, Saliba AE, Deghou S, Anand K, Ceschia S, Doerks T et al. Lipid cooperativity as a general membrane-recruitment principle for PH domains. *Cell Rep*. 2015;12:1519–1530.
41. Jaiswal M, Dvorsky R, Ahmadian M. Deciphering the molecular and functional basis of Dbl family proteins: a novel systematic approach toward classification of selective activation of the Rho family proteins. *J. Biol. Chem*. 2013;288:4486–4500.
42. Maliuta O, Nezeliuk O, Yefremenko D, Telegeiev G, Karpov O. Obtaining of recombinant C2 domain of Bcr protein. *Ukrainian Food Journal*. 2013;2:2.
43. Pappa H, Murray-Rust J, Dekker LV, Parker PJ, McDonald NQ. Crystal structure of the C2 domain from protein kinase C-delta. *Structure*. 2008; 6(7):885–894.
44. Cho W, Stahelin RV. Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 26(8):838–851.

45. Randolph T. Focus: myelocytic leukemia. *Clin Lab Sci.* 2005;18(1):38.
46. Sharma N, Magistrini V, Piazza R, Citterio S, Mezzatesta C, Khandelwal P, et al. BCR/ABL1 and BCR are under the transcriptional control of the MYC oncogene. *Molecular Cancer.* 2015;14:132.
47. Cilloni D, Saglio G. Molecular Pathways: BCR-ABL. *Clinical Cancer Research.* 2012;18:4:930-937.
48. Li Q, Wu Y, Fang S, Wang L, Qi H, Zhang Y. BCR/ABL oncogene-induced PI3K signaling pathway leads to chronic myeloid leukemia pathogenesis by impairing immuno-modulatory function of hemangioblasts. *Cancer Gene Ther.* 2015;May;22(5):227-37.
49. M Wagle, A M Eiring, M Wongchenko, S Lu, Y Guan, Y Wang et al. A role for FOXO1 in BCR-ABL1-independent tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia *Leukemia.* 2016 Jul;30(7):1493–1501.
50. Crivellaro S, Carrà G, Panuzzo C, Taulli R, Guerrasio A, Saglio G. The non-genomic loss of function of tumor suppressors: An essential role in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia chronic phase. *BMC Cancer.* 2016;16:314.
51. Schaller-Schönitz M, Barzan D, Williamson A, Griffiths J, Dallmann I, Battmer K. BCR-ABL Affects STAT5A and STAT5B Differentially. *PLoS One.* 2014;9(5):e97243.
52. Schafranek L, Nievergall E, Powell J, Hiwase D, White D, Hughes T. et al. STAT5 Is a Critical Component Of The Time-Dependent Sensitivity Of CML Cells To TKI Treatment In a Bcr-Abl-Dependent, But JAK2-Independent Manner. *Blood.* 2013;122(21):2705.
53. Siveen K, Prabhu K, Achkar I, Kuttikrishnan S, Shyam S, Khan A, et al. Role of Non Receptor Tyrosine Kinases in Hematological Malignances and its Targeting by Natural Products. *Molecular Cancer.* 2018;17:31.
54. Lamontanara A, Georgeon S, Tria G, Svergun D, Hantschel O. The SH2 domain of Abl kinases regulates kinase autophosphorylation by controlling activation loop accessibility. *Nature Communications.* 2014;5:5470.

55. Gao M, Huang Z, Tao K, Xiao Q, Wang X, Cao W, et al. Depression of oncogenicity by dephosphorylating and degrading BCR-ABL. *Oncotarget*. 2017;8:3304-3314.
56. Kim H, Gillis L, Jarvis J, Yang S, Huang K, Der S et al. Tyrosine kinase chromosomal translocations mediate distinct and overlapping gene regulation events. *BMC Cancer*. 2011;11:528.
57. Korn C, Méndez-Ferrer S. Myeloid malignancies and the microenvironment. *Blood*. 2017; Feb 16;129(7):811–822.
58. Li Y, Clough N, Sun X, Yu W, Abbott B, Hogan C et al. Bcr-Abl induces abnormal cytoskeleton remodeling,  $\beta 1$  integrin clustering and increased cell adhesion to fibronectin through the Abl interactor 1 pathway. *Journal of Cell Science*. 2007;120:1436-1446.
59. Witte O, Kabarowski J. Consequences of BCR-ABL Expression within the Hematopoietic Stem Cell in Chronic Myeloid Leukemia. *Stem Cells*. 2000;18(6):399-408.
60. Rizo A, Vellenga E, Haan G, Schuringa J. Signaling pathways in self-renewing hematopoietic and leukemic stem cells: do all stem cells need a niche? *Human Molecular Genetics*, 2006; Oct;15:210–219.
61. Goldman J. Chronic myeloid leukemia: a historical perspective. *Seminars in Hematology*. 2010;47:4:302–311.
62. Report of the Medical Research Council's working party for therapeutic trials in leukemia, "Chronic granulocytic leukemia: comparison of radiotherapy and busulphan therapy," *British Medical Journal*. 1968;1:201–208.
63. Kujawski L, Talpaz M. The role of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007 Oct-Dec;18(5-6):459-71.
64. Sacha T. Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia: an Overview *Mediterr. J Hematol Infect Dis*. 2014; 6(1):e2014007.
65. Hochhaus A, Baccarani M, Silver R, Schiffer C, Cervantes F. et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020; 34:966–984.

66. Iqbal N, Iqbal N. Imatinib: A Breakthrough of Targeted Therapy in Cancer. *Chemotherapy Research and Practice*. 2014; 2014:357027.
67. Berman E, Jhanwar S, Hedvat C, Arcila M, Abdel-Wahab O, Levine R. Resistance to Imatinib in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia and the Splice Variant BCR-ABL1<sup>35INS</sup>. *Leuk Res*. 2016; Oct:49:108–112.
68. Hughes TP, Saglio G, Quintas-Cardama A, Mauro MJ, Kim D-W, Lipton JH, et al. BCR-ABL1 mutation development during first line treatment with dasatinib or imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Leukemia*. 2015; 29:1832–1838.
69. Bixby D, Talpaz M. Seeking the causes and solutions to imatinib-resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011; 25:7–22.
70. Mauro M. Defining and Managing Imatinib Resistance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006; 2006:(1): 219–225.
71. Milojkovic D, Apperley J. Mechanisms of Resistance to Imatinib and Second-Generation Tyrosine Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research*. 2009; 15:24:7519-7527.
72. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov Y, Sougnez C, Stevenson K, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365:2497–2506 .
73. Ongoren S, Eskazan A, Suzan V, Savci S, Ozunal I, Berk S. Third-line treatment with second-generation tyrosine kinase inhibitors (dasatinib or nilotinib) in patients with chronic myeloid leukemia after two prior TKIs: real-life data on a single center experience along with the review of the literature. *Hematology*. 2018; 2364:212-220.
74. Gugliotta G, Castagnetti F, Fogli M, Cavo M, Bacarani M, Rosti G. Impact of comorbidities on the treatment of chronic myeloid leukemia with tyrosine-kinase inhibitors. *Expert Rev Hematol*. 2013; 6(5):563–574.
75. Amsberg G, Schafhausen P. Bosutinib in the management of chronic myelogenous leukemia. *Biologics*. 2013; 7:115–122.

76. Lomaia E, Zaritsky A, Shuvaev V, Milojkovic D, Szydlo R, Khorashad JS, et al. Efficacy of tyrosine kinase inhibitors in third line therapy in chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2015; 126(23):4051.
77. Carneiro BA, Kaplan JB, Giles FJ. Tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukemia: update on key adverse events. *Expert Rev Hematol*. 2015; 8(4):457–479.
78. Redaelli S, Piazza R, Rostagno R, Magistroni V, Perini P, Marega M. Activity of Bosutinib, Dasatinib, and Nilotinib Against 18 Imatinib-Resistant BCR/ABL Mutants. *Journal of Clinical Oncology*. 2016; Jan 20;27(3):469-71.
79. Breccia M, Alimena G. Second-generation tyrosine kinase inhibitors (Tki) as salvage therapy for resistant or intolerant patients to prior TKIs. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014; 6(1):e2014003.
80. Wang W, Cortes JE, Tang G, Khoury JD, Wang S, Bueso-Ramos CE, et al. Risk stratification of chromosomal abnormalities in chronic myelogenous leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood*. 2016; 127:2742–50.
81. Reddy E, Aggarwal A. The ins and outs of Bcr-Abl inhibition. *Genes and Cancer*. 2012; 3:447–54.
82. Redaelli S, Mologni L, Rostagno R, Piazza R, Magistroni V, Ceccon M et al. Three novel patient-derived BCR/ABL mutants show different sensitivity to second and third generation tyrosine kinase inhibitors. *American Journal of Hematology*. 2012; Nov 87:125-128.
83. Rossari F, Minutolo F, Orciuolo E. Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: from chemical development to clinical efficacy. *J Hematol Oncol*. 2018;11:84.
84. Nicolini F, Basak G, Kim D, Olavarria E, Pinilla-Ibarz J, Apperley JF, et al. Overall survival with ponatinib versus allogeneic stem cell transplantation in Philadelphia chromosome-positive leukemias with the T315I mutation. *Cancer*. 2017;123:2875–80.
85. Pavlovsky C, Chan O, Talati C, Pinilla-Ibarz J. Ponatinib in the treatment of chronic myeloid leukemia and philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Future Oncol*. 2019; Jan 15(3):257-269.

86. Müller MC, Cervantes F, Hjorth-Hansen H, Janssen JJWM, Milojkovic D, Rea D, Rosti G. Ponatinib in chronic myeloid leukemia (CML): Consensus on patient treatment and management from a European expert panel. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017; Dec:120:52-59.
87. Bucelli C, Cattaneo D, Ferla V, Zappa M, de Benedittis C, Soverini S, Iurlo A. et al Ponatinib as a Valid Alternative Strategy in Patients with Blast Crisis-Chronic Myeloid Leukemia Not Eligible for Allogeneic Stem Cells Transplantation and/or Conventional Chemotherapy: Report of a Case. *Case Reports in Hematology*. 2017; 2017:6167345.
88. Zhang H, He X, Ni D, Mou L, Chen X, Lu S. How does the novel T315L mutation of breakpoint cluster region-abelson (BCR-ABL) kinase confer resistance to ponatinib: a comparative molecular dynamics simulation study. *J Biomol Struct Dyn*. 2020; Jan 38(1):89-100.
89. Soverini S, Abruzzese I, Bocchia M, Bonifacio M, Galimberti S, Gozzini A, et al. Next-generation sequencing for BCR-ABL1 kinase domain mutation testing in patients with chronic myeloid leukemia: a position paper. *Journal of Hematology & Oncology*. 2019; 12:131.
90. Ting S, Mixue X, Lixia Z, Xueying L, Wanzhuo X, Xiujin Y. T315I mutation exerts a dismal prognosis on adult BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia, and salvage therapy with ponatinib or CAR-T cell and bridging to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation can improve clinical outcomes. *Annals of Hematology*. 2020; 99:829–834.
91. Wang D, Pan H, Wang Y. T315L: a novel mutation within BCR-ABL kinase domain confers resistance against ponatinib. Agnieszka Wieczorek, Lutz Uharek Management of Chronic Myeloid Leukemia Patients Resistant to Tyrosine Kinase Inhibitors Treatment Biomark Insights. *Leuk Lymphoma*. 2017; Jul 58(7):1733-1735.
92. Wieczorek A, Uharek L. Management of Chronic Myeloid Leukemia Patients Resistant to Tyrosine Kinase Inhibitors Treatment. *Biomark Insights*. 2015; 10(Suppl 3):49–54.

93. Schoepfe J, Jahnke W, Berellini G, Buonamici S, Cotesta S, Cowan-Jacob C. Discovery of Asciminib (ABL001), an Allosteric Inhibitor of the Tyrosine Kinase Activity of BCR-ABL1. *J. Med. Chem.* 2018; 61:18:8120-8135.
94. Massimino M, Stella S, Tirro E, Romano C, Pennisi MS, Puma A, et al. Non ABL-directed inhibitors as alternative treatment strategies for chronic myeloid leukemia. *Mol Cancer.* 2018; 17:56.
95. Peng C, Brain J, Hu Y, Goodrich A, Kong L, Grayzel D, et al. Inhibition of heat shock protein 90 prolongs survival of mice with BCR-ABL-T315I-induced leukemia and suppresses leukemic stem cells. *Blood.* 2007; 110:678–85.
96. Peng C, Li D, Li S. Heat shock protein 90: a potential therapeutic target in leukemic progenitor and stem cells harboring mutant BCRABL resistant to kinase inhibitors. *Cell Cycle.* 2007; 6:2227–31.
97. Gandhi V, Plunkett W, Cortes JE. Omacetaxine: a protein translation inhibitor for treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res.* 2014; 20:1735–40.
98. Alvandi F, Kwitkowski VE, Ko CW, Rothmann MD, Ricci S, Saber H, et al. Food and Drug Administration approval summary: omacetaxine mepesuccinate as treatment for chronic myeloid leukemia. *Oncologist.* 2014; 19:94–9.
99. Shimokawa K, Shibata N, Sameshima T, Miyamoto N, Ujikawa O, Nara H, et al. Targeting the allosteric site of oncoprotein BCR-ABL as an alternative strategy for effective target protein degradation. *ACS Med Chem Lett.* 2017; 8:1042–7.
100. Shibata N, Shimokawa K, Nagai K, Ohoka N, Hattori T, Miyamoto N, et al. Pharmacological difference between degrader and inhibitor against oncogenic BCR-ABL kinase. *Sci Rep.* 2018; 8:13549.
101. Sun H, Kapuria V, Peterson L, Fang D, Bornmann WG, Bartholomeusz G, et al. Bcr-Abl ubiquitination and Usp9x inhibition block kinase signaling and promote CML cell apoptosis. *Blood* 2011; 117:3151-3162.
102. Patel K, Ahmed Z, Huang X, Yang Q, Ekinci E, Neslund-Dudas CM et al. Discovering proteasomal deubiquitinating enzyme inhibitors for cancer therapy: lessons from rational design, nature and old drug reposition. *Future Med Chem.* 2018; 10(17): 2087–2108.



103. García-Santisteban I, Peters G, Giovannetti E, Jose Antonio Rodríguez USP1 deubiquitinase: cellular functions, regulatory mechanisms and emerging potential as target in cancer therapy, *Mol Cancer*, 2013 Aug 10;12:91.
104. Yu Z, Song H, Jia M, et al. USP1–UAF1 deubiquitinase complex stabilizes TBK1 and enhances antiviral responses. *JEM* 2017; 214: (12): 3553.
105. Das D, Das A, Ray A, Song Y, Samur M, Munshi N, et al. Blockade of Deubiquitylating Enzyme USP1 Inhibits DNA Repair and Triggers Apoptosis in Multiple Myeloma Cells. *Clin Cancer Res*. 2017; 1:23(15):4280-4289.
106. Ma A, Tang M, Zhang L, Boshi Wang, Zhaojuan Yang, Yun Liu et al. USP1 inhibition destabilizes KPNA2 and suppresses breast cancer metastasis. *Oncogene*. 2019; 38: 2405–2419.
107. Cai J, Culley M, Zhao Y, Jing Zhao The role of ubiquitination and deubiquitination in the regulation of cell junctions. *Protein & Cel*. 2017; 9:754-769.
108. Suresh B, Lee J, Kim K, Suresh Ramakrishna. The Importance of Ubiquitination and Deubiquitination in Cellular Reprogramming. *Stem Cells International*. 2016; 2016:6705927.
109. Bandish B, Gartenhaus KR. DUBbing Down Translation: The Functional Interaction of Deubiquitinases with the Translational Machinery. *Molecular cancer Therapeutics*. 2019; 18:9.
110. Komander D. Mechanism, specificity and structure of the deubiquitinases. *Sub-Cell Biochem*. 2010; 54:69–87.
111. Luise C, Capra M, Donzelli M, Mazzarol G, Jodice MG, Nuciforo P, et al. An atlas of altered expression of deubiquitinating enzymes in human cancer. *PLoS ONE*. 2011; 6(1):e15891.
112. Zheng N, Shabek N. Ubiquitin ligases: structure, function, and regulation. *Annu Rev Biochem*. 2017; 86:129–57.
113. Urszula L. McClurg, Craig N. Robson Deubiquitinating enzymes as oncotargets *Oncotarget*. 2015; Apr 30:6(12):9657–9668.

114. Hanpude P, Bhattacharya S, Dey A, Maiti T. Deubiquitinating Enzymes in Cellular Signaling and Disease Regulation. *IUBMB Life*. 2015; Jul 67(7):544-55.
115. He M, Zhou Z, Shah A, Zou H, Tao J, Chen Q et.al. The emerging role of deubiquitinating enzymes in genomic integrity, diseases, and therapeutics, *Cell Biosci*. 2016; 6:62.
116. Haq S, Ramakrishna S. Deubiquitylation of deubiquitylases. *Open Biol*. 2017; Jun 7(6):170016.
117. Reyes-Turcu F, Wilkinson K. Polyubiquitin binding and disassembly by deubiquitinating enzymes. *Chem Rev*. 2009; Apr:109(4):1495–1508.
118. Clague M, Coulson J, Urbé S. Cellular functions of the DUBs. *Journal of Cell Science*. 2012; 125:277-286.
119. Yuan T, Yan F, Ying M, Cao J, He Q, Zhu H, et al Inhibition of Ubiquitin-Specific Proteases as a Novel Anticancer Therapeutic Strategy. *Front Pharmacol*. 2018; 9:1080.
120. Regulation of proteolysis by human deubiquitinating enzymes. *Eletr ZM, Wilkinson KD. Biochim Biophys Acta*. 2014 Jan;1843(1):114-28
121. Pinto-Fernandez A, Kessler BM. DUBbing cancer: deubiquitylating enzymes involved in epigenetics, DNA damage and the cell cycle as therapeutic targets. *Front Genet*. 2016;7.
122. Ohayon S, Spasser L, Aharoni A, Brik A. Targeting deubiquitinases enabled by chemical synthesis of proteins. *J Am Chem Soc*. 2012; 134(6):3281–9.
123. Hussain S, Zhang Y, Galardy P. DUBs and cancer: the role of deubiquitinating enzymes as oncogenes, non-oncogenes and tumor suppressors. *Cell Cycle*. 2009; 8(11):1688–97.
124. Leznicki P, Kulathu Y. Mechanisms of regulation and diversification of deubiquitylating enzyme function. *J Cell Sci*. 2017 Jun 15;130(12):1997-2006.
125. Turcu F, Ventii K, Wilkinson K. Regulation and Cellular Roles of Ubiquitin-specific Deubiquitinating Enzymes *Annu Rev Biochem*. 2009; 78:363–397.
126. Eletr ZM, Wilkinson KD. Regulation of proteolysis by human deubiquitinating enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1843(1):114-128.

127. Xiao Z, Zhang P, Ma L. The role of deubiquitinases in breast cancer. *Cancer Metastasis Reviews*. 2016; Dec 35(4):589-600.
128. Wei R, Liu X, Yu W, Yang T, Cai W, Liu J, et al. Deubiquitinases in cancer. *Oncotarget*. 2015; 6:12872–89.
129. Bishop P, Rocca D, Henley JM. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1): structure, distribution and roles in brain function and dysfunction. *Biochem J*. 2016; 473:2453–62.
130. Singh N, Singh A. Deubiquitinases and cancer: A snapshot *Critical Reviews in Oncology. Hematology*. 2016; Jul 103:22-26.
131. Davis M, Simeonov A. Ubiquitin-Specific Proteases as Druggable Targets *Drug Target Rev*. 2015; Aut 2(3):60–64.
132. Fraile J, Quesada V, Rodríguez D, Freije J, López-Otín C. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene*. 2012; 31:2373–2388.
133. Hermanns T, Pichlo C, Woiwode I, Klopffleisch K, Witting K, Ovaas H, et al A family of unconventional deubiquitinases with modular chain specificity determinants. *Nature Communications*. 2018; 9:799.
134. Ronau J, Beckmann J, Hochstrasser J. Substrate specificity of the ubiquitin and Ubl proteases. *Cell Research*. 2016; 26:441–456.
135. Eletr ZK, Wilkinson D. Regulation of proteolysis by human deubiquitinating enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2014; Jan 1843:1:114-128.
136. Olazabal-Herrero A, García-Santisteban I, Rodríguez J Structure-function analysis of USP1: insights into the role of Ser313 phosphorylation site and the effect of cancer-associated mutations on autocleavage. *Mol Cancer*. 2015; 14(1):33.
137. Goldbraikh D, Neufeld D, Mutlak-Eid Y, Lasry I, Gilda JE, Parnis A, et al. USP1 deubiquitinates protein kinase Akt to inhibit PI3K-Akt-FoxO signaling. *EMBO Rep*. 2020; Apr 3:21(4):e48791.

138. Gorrepati K, Lupse B, Annamalai K, Yuan T, Maedler K, Ardestani A, et al. Loss of Deubiquitinase USP1 Blocks Pancreatic b-Cell Apoptosis by Inhibiting DNA Damage Response. *iScience*. 2018; 23:72–86.
139. Arkinson C, Chaugule V, Toth R, Walden H. Specificity for deubiquitination of monoubiquitinated FANCD2 is driven by the N-terminus of USP1. *Life Sci Alliance*. 2018; Oct 1(5):e201800162.
140. García-Santisteban I, Peters GJ, Giovannetti E, Rodríguez JA. USP1 deubiquitinase: Cellular functions, regulatory mechanisms and emerging potential as target in cancer therapy. *Mol Cancer*. 2013; Aug 10;12:91.
141. Faesen AC, Luna-Vargas MP, Geurink PP, Clerici M, Merckx R, Van Dijk WJ, et.al. The differential modulation of USP activity by internal regulatory domains, interactors and eight ubiquitin chain types. *Chem Biol*. 2011; 18(12):1550–1561.
142. Cotto-Rios X, Jones M, Huang T. Insights into phosphorylation-dependent mechanisms regulating USP1 protein stability during the cell cycle. *Cell Cycle*. 2011; Dec 1:10(23):4009–4016.
143. Cotto-Rios XM, Jones MJ, Busino L, Pagano M, Huang T. TAPC/CCdh1-dependent proteolysis of USP1 regulates the response to UV-mediated DNA damage. *Journal of Cell Biology*. 2011; Jul 194(2):177-186.
144. Cotto-Rios XM, Békés M, Chapman J, Ueberheide B, Huang TT. Deubiquitinases as a Signaling Target of Oxidative Stress. *Cell Rep*. 2012; Dec 27; 2(6):1475-84.
145. Xu X, Li S, Cui X, Han K, Wang J, Hou X. Inhibition of Ubiquitin Specific Protease 1 Sensitizes Colorectal Cancer Cells to DNA-Damaging Chemotherapeutics. 2019; 9:1406.
146. Twest S, Murphy V, Hodson C, Tan W, Swuec P, O'Rourke J. Mechanism of Ubiquitination and Deubiquitination in the Fanconi Anemia Pathway. *Molecular Cell*. 2017; Jan 65:247–259.
147. Williams SA, Maecker HL, French DM, Liu J, Gregg A, Silverstein LB, et.al. USP1 deubiquitinates ID proteins to preserve a mesenchymal stem cell program in osteosarcoma. *Cell*. 2011; Sep 16:146(6):918-30.

148. Raimondi M, Cesselli D, Loreto C, Marra F, Schneider C, Demarchi F, et al. USP1 (ubiquitin specific peptidase 1) targets ULK1 and regulates its cellular compartmentalization and autophagy. *Autophagy*. 2019; 15(4):613–630.
149. Ma A, Tang M, Zhang L, Wang B, Yang Z, Liu Y, et al. USP1 inhibition destabilizes KPNA2 and suppresses breast cancer metastasis. *Oncogene*. 2019; Mar 38(13):2405-2419.
150. Das S, Song Y, Ray A, Richardson P, Chauhan D, Anderson K. Targeting Deubiquitylating Enzyme USP1 in Multiple Myeloma. *Blood*. 2015; 126(23):1813.
151. Cui SZ, Lei ZY, Guan TP, Fan LL, Li YQ, Geng XY. Targeting USP1-dependent KDM4A protein stability as a potential prostate cancer therapy. *Cancer Sci*. 2020; Mar 4.
152. Chen J, Dexheimer T, Ai Y, Liang Q, Villamil M, Inglese J. Selective and cell-active inhibitors of the USP1/UAF1 deubiquitinase complex reverse cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells. *Chem Biol*. 2011; Nov 23:18(11):1390–1400.
153. Mistry H, Hsieh G, Buhrlage S, Huang M, Park E, Cuny G. Small molecule inhibitors of USP1 target ID1 degradation in leukemic cells. *Mol Cancer Ther*. 2013; Dec 12(12):2651–2662.
154. Dexheimer T, Rosenthal A, Liang Q, Chen J, Villamil MA, Kerns EH, et al. Discovery of ML323 as a Novel Inhibitor of the USP1/UAF1 Deubiquitinase Complex. *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program Received*. 2012.
155. Yu Z, Song H, Jia M, Zhang J, Wang W, Li Q. USP1-UAF1 Deubiquitinase Complex Stabilizes TBK1 and Enhances Antiviral Responses. *J Exp Med*. 2017; 214(12):3553-3563.
156. Steegmaier M, Borges E, Berger J, Schwarz H, Vestweber D. The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface. *J Cell Sci*. 1997; Mar:110( Pt 6):687-94.

157. Yasmin-Karim S, King M, Messing E, Lee Y. E-selectin ligand-1 controls circulating prostate cancer cell rolling/adhesion and metastasis *Oncotarget*. 2014; Dec 5(23):12097–12110.
158. Zarbock A, Ley K, McEver R, Hidalgo A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood*. 2011; Dec 22;118(26):6743–6751.
159. Mourelatos Z, Gonatas JO, Cinato E, Gonatas NK. Cloning and sequence analysis of the human MG160, a fibroblast growth factor and E-selectin binding membrane sialoglycoprotein of the Golgi apparatus. *DNA Cell Biol*. 1996; Dec 15(12):1121-8.
160. Croul S, Mezitis SG, Stieber A, Chen YJ, Gonatas JO, Goud B, et.al. Immunocytochemical visualization of the Golgi apparatus in several species, including human, and tissues with an antiserum against MG-160, asialoglycoprotein of rat Golgi apparatus. *J Histochem Cytochem*. 1990; Jul;38(7):957-63.
161. Willmroth F, Beaudet A. Structure of the murine E-selectin ligand 1 (ESL-1) gene and assignment to Chromosome 8. *Mammalian Genome*. 1999; 10:1085–1088.
162. Miyaoka Y, Kato H, Ebato K, Saito S, Miyata N, Imamura T, et al. Retention in the Golgi apparatus and expression on the cell surface of Cfr/Esl-1/Glg-1/MG-160 are regulated by two distinct mechanisms. *Biochem J*. 2011; Nov 15;440(1):33-41.
163. Steegmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, Borges E, Lenter M, Kocher, et.al. The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature*. 1995; Feb 16;373(6515):615-20.
164. Antoine M, Kohl R, Tag CG, Gressner AM, Hellerbrand C, Kiefer P. (2009) Secreted cysteine-rich FGF receptor derives from post-translational processing by furin-like prohormone convertases. *Biochem*. 2009; 382:359–364.
165. Planche A, Bacac M, Stamenkovic I. The Golgi protein GLG1 participates in tumor progression. *Molecular and Cellular Biology*. 2012; 72:8:3245.

166. Ahn J, Febbraio M, Silverstein RL. A novel isoform of human Golgi complex-localized glycoprotein-1 (also known as E-selectin ligand-1, MG-160 and cysteine-rich fibroblast growth factor receptor) targets differential subcellular localization. *J Cell Sci.* 2005; 118:1725-1731.
167. Burrus LW, Zuber ME, Lueddecke BA, Olwin BB. Identification of a cysteine-rich receptor for fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol.* 1992; Dec 12(12):5600-9.
168. Esposito M, Mondal N, Greco TM, Wei Y, Spadazzi C, Li S. et al. Bone vascular niche E-selectin induces mesenchymal-epithelial transition and Wnt activation in cancer cells to promote bone metastasis. *Nature Cell Biology.* 2019; Apr 21(5):627-639.
169. Cassandri M, Smirnov A, Novelli F, Pitolli C, Agostini M, Malewicz M, et al. Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discovery.* 2017; Nov 13:3:17071.
170. Kang J, Kim J. Zinc Finger Proteins as Designer Transcription Factors. *The Journal of Biological Chemistry.* 2000; 275:8742:8748.
171. Jen J, Wang Y. Zinc finger proteins in cancer progression. *Journal of Biomedical Science.* 2016; 3:17071.
172. Nunez N, Clifton MM, Funnell AP, Artuz C, Hallal S, Quinlan KG, et al. The multi-zinc finger protein ZNF217 contacts DNA through a two-finger domain. *J Biol Chem.* 2011; Nov 4:286(44):38190-201.
173. Krishna S, Majumdar I, Grishin N. Survey and summary: Structural classification of zinc fingers. *Nucleic Acids Res.* 2003; Jan 15:31(2):532–550.
174. Gersbach C, Gaj T, Barbas C. III Synthetic Zinc Finger Proteins: The Advent of Targeted Gene Regulation and Genome Modification Technologies. *Acc Chem Res.* 2014; Aug 19:47(8):2309–2318.
175. Cohen P, Donini C, Nguyen N, Lincet H, Vendrel J. The dark side of ZNF217, a key regulator of tumorigenesis with powerful biomarker value. *Oncotarget.* 2015; Dec 8:6(39):41566–41581.
176. Quinlan K, Nardini M, Verger A, Francescato P, Yaswen P, Corda D, et al.

- Specific Recognition of ZNF217 and Other Zinc Finger Proteins at a Surface Groove of C-Terminal Binding Proteins. *American Society for Microbiology*. 2006; Nov. 26:21:8159–8172.
177. Mueller A, Corbi-Verge C, Giganti D, Ichikawa D, Spencer J, MacRae M, et al. The Geometric Influence on the Cys2His2 Zinc Finger Domain and Functional. *Plasticity Nucleic Acids Res*. 2020; May 8:291.
178. Rahman MT, Nakayama K, Rahman M, Nakayama N, Ishikawa M, Katagiri A, et al. Prognostic and therapeutic impact of the chromosome 20q13. 2 ZNF217 locus amplification in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer*. 2012; 118:2846–2857.
179. Cowger JJ, Zhao Q, Isovich M, Torchia J. Biochemical characterization of the zinc-finger protein 217 transcriptional repressor complex: identification of a ZNF217 consensus recognition sequence. *Oncogene*. 2007; May 17:26(23):3378–86.
180. Loh C, Chai J, Tang T, Wong W, Sethi G, Shanmugam M, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges *Cells*. 2019; Oct 8(10):1118.
181. Krig S, Jin V, Bieda M, O'Geen H, Yaswen P, Green R. Identification of genes directly regulated by the oncogene ZNF217 using ChIP-chip assays. *J Biol Chem*. 2007; Mar 282(13): 9703–9712.
182. Jiang X, Zhang C, Qi S, Guo S, Chen Y, Du E. Elevated expression of ZNF217 promotes prostate cancer growth by restraining ferroportin-conducted iron egress. *Oncotarget*. 2016; Dec 7(51):84893-84906.
183. Zhang W, Wu X, Shi T, Xu H, Yi J, Shen H, et al. Regulation of Transcription Factor Yin Yang 1 by SET7/9-mediated Lysine Methylation *Scientific*. *Sci Rep*. 2016; 6: 21718.
184. Fang Z, Xiong Y, Zhang C, Li J, Liu L, Li M, Wei Zhang W, et al. Coexistence of copy number increases of ZNF217 and CYP24A1 in colorectal cancers in a Chinese population. *Oncology letters*. 2010; Sep 1(5):925–930.
185. Banck M, Li S, Nishio H, Wang C, Beutler A, Walsh M. The ZNF217



- oncogene is a candidate organizer of repressive histone modifiers. *Epigenetics*. 2009; Feb 16:4(2):100–106.
186. Huang G, Krig S, Kowbel D, Xu H, Hyun B, Volik S, et al. ZNF217 suppresses cell death associated with chemotherapy and telomere dysfunction. *Hum Mol Genet*. 2005; Nov 1:14(21):3219-25.
187. Vendrell JA, Thollet A, Nguyen NT, Ghayad SE, Vinot S, Bièche I, et al. ZNF217 is a marker of poor prognosis in breast cancer that drives epithelial-mesenchymal transition and invasion. *Cancer Res*. 2012; Jul 15:72(14):3593-606.
188. Li J, Song L, Qiu Y, Yin A, Zhong M. ZNF217 is associated with poor prognosis and enhances proliferation and metastasis in ovarian cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7(6):3038–3047.
189. Littlepage L, Adler A, Kouros-Mehr H, Huang G, Chou J, Krig S, et al. The Transcription Factor ZNF217 Is a Prognostic Biomarker and Therapeutic Target during Breast Cancer Progression. *Cancer Discov*. 2012; Jul 2(7):638–651.
190. Mao X, Yan M, Xue X, Zhang X, Ren H, Guo G, et al. Overexpression of ZNF217 in glioblastoma contributes to the maintenance of glioma stem cells regulated by hypoxia-inducible factors. *Laboratory Investigation*. 2011; 91:1068–1078.
191. Szczyrba J, Nolte E, Hart M, Doll C, Wach S, Taubert H, et al. Identification of ZNF217, hnRNP-K, VEGF-A and IPO7 as targets for microRNAs that are downregulated in prostate carcinoma. *Int. J. Cancer*. 2013; 132:775–784.
192. Shi L, Garofalo M. Role of microRNAs in chemoresistance Peter Magee. *Ann Transl Med*. 2015; Dec 3(21):332.
193. Bäckström A, Kugel L, Gnann C, Xu H, Aslan J, Lundberg E, Stadler C. A sample preparation protocol for high throughput immunofluorescence of suspension cells. *Biorxiv*. 2020.
194. Tsang M, Gantchev J, Ghazawi FM, Litvinov IV. Protocol for adhesion and immunostaining of lymphocytes and other non-adherent cells in culture. *Biotechniques*. 2017; 63(5):230-233.
195. Harlow E, Lane D. Fixing suspension cells with paraformaldehyde. *CSH*

- Protoc. 2006; Aug 1:2006(3).pii:pdb.prot4295.
196. Dunn K, Kamocka M, McDonald J. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Cell Physiol.* 2011; 300:4:723-742.
  197. Zinchuk V, Zinchuk O, Okada T. Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: Pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochem Cytochem.* 2007; 40:101-111.
  198. Shibata N, Ohoka N, Hattori T, Naito M, Shibata N, Ohoka N et.al. Development of a Potent Protein Degradator against Oncogenic BCR-ABL Protein. *Chemical & Pharmaceutical bulletin;* 2019:67(3):165-172.
  199. Sun H, Kapuria V, Peterson LF, Fang D, Bornmann WG, Bartholomeusz G, et.al. Bcr-Abl ubiquitination and Usp9x inhibition block kinase signaling and promote CML cell apoptosis. *Blood.* 2011; 117(11):3151–3162.
  200. Jang H. Regulation of Protein Degradation by Proteasomes in Cancer. *J Cancer Prev.* 2018; Dec 23(4):153–161.
  201. Lee M, Yaffe M. Protein Regulation in Signal Transduction Cold Spring. *Harb Perspect Biol.* 2016; Jun 8(6):a005918.
  202. Kliza K, Husnjak K. Resolving the Complexity of Ubiquitin Networks. *Front Mol Biosci.* 2020; 7:21.
  203. Suresh B, Lee J, Kim KS, Ramakrishna S. The Importance of Ubiquitination and Deubiquitination in Cellular Reprogramming. *Stem Cells Int.* 2016; 2016:6705927.

## ДОДАТОК А

### ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Гур'янов Д, Лисецька Т, Кравчук І, **Антоненко С**, Телегеев Г.Д. Роль домену PH білка BCR у клітинних процесах, що визначають фенотип Ph<sup>+</sup>-позитивних мієлопроліферативних захворювань. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2014;15:44-48.
2. **Антоненко С**, Кравчук І, Гур'янов Д, Телегеев Г. Убіквітин специфічна протеаза 1 (USP1) – потенційний партнер Bcr-Abl онкобілку: біоінформатичний аналіз та отримання рекомбінантних конструкцій. Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. 2014;12(2):249-255.
3. **Antonenko S**, Gurianov D, Telegeev G. Colocalization of USP1 and PH domain of BCR-ABL oncoprotein in terms of chronic myeloid leukemia cell rearrangements. Cytology and Genetics. 2016;50(4):11-15.
4. **Антоненко С**, Кравчук І, Гур'янов Д, Телегеев Г. Білки партнери PH протеїна Bcr-Abl: створення генетичних конструкцій для виявлення молекулярних особливостей розвитку ХМЛ . Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017;20:47-52.
5. **Антоненко С**, Гур'янов Д, Кравчук І, Телегеев Г. Аналіз клітинної локалізації PH домена Bcr-Abl з білком USP1 та розробка програми для оцінки їх сайтів фосфорилування. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2018;22:90-95.
6. **Антоненко С**, Поліщук Ю, Телегеев Г. Фосфорилування сайтів Tyr білка USP1 у клітинах K562 як фактор прогресії хронічної мієлоїдної лейкемії. Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. 2019;17(2):249-255.

7. **Antonenko S**, Kravchuk I, Telegeev G. Bcr-Abl oncoprotein interacts with GLG1 in K562 cells: role in pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cytology and Genetics*. 2020;54(1):62-70.
8. **Antonenko S**, Telegeev G. Inhibition of USP1, a new partner of Bcr-Abl, results in decrease of Bcr-Abl levels in K562 cells. *Experimental oncology*. 2020;42(2):109-114.
9. **Antonenko S**, Cherepenko O, Telegeev G. Gene signatures in cancer may also overlap at the level of the product special domain organization and function: SW01. 38th FEBS congress; 2013 July 6-11, St.Petersburg, Russia.
10. **Antonenko S**, Telegeev G. USP1 as a potential partner of Bcr-Abl oncoprotein. VIII Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine dedicated to 90<sup>th</sup> Anniversary of P.G.Kostyuk; 2014 May 20-21, Kyiv, Ukraine.
11. **Antonenko S**, Gurianov D, Telegeev G. Colocalization of USP1 protein and PH domain Bcr-Abl oncoprotein as precondition of their interaction with CML. CYS conference of Young Scientists; 2015 September 21-25, Kyiv, Ukraine.
12. **Antonenko S**, Telegeev G. Colocalization of USP1 protein and PH domain of Bcr-Abl oncoprotein in HEK293 cells. XI Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine dedicated to 160<sup>th</sup> Anniversary of M. F. Kastschenko; 2015 May 26-27, Kyiv, Ukraine.
13. Дуридівка О, **Антоненко С**. Створення генетичної конструкції рCMV-НА-USP1 для еукаріотичної експресії рекомбінантного білка USP1. X Міжнародна конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери»; 2015 грудень 2-4, Харків, Україна.
14. Gurianov D, **Antonenko S**, Telegeev G. Colocalization analysis shows the role of PH domain of BCR in proteasomal degradation and clathrin-mediated endocytosis. Young Scientist Forum «Molecules in Living Cells and in Innovative Medicine»; 2016 July 10-12, Wrocław, Poland.

15. **Антоненко С**, Гурянов Д, Кравчук І, Телегєєв Г. Колокалізація USP1 і CTTN із PH доменом онкобілка та їх роль у розвитку ХМЛ. XIII з'їзд онкологів та радіобіологів України; 2016 травень 26-28, Київ, Україна.
16. Gurianov D, **Antonenko S**, Kravchuk I, Telegeev G. Colocalization analysis shows that PH domain of BCR may play role in proteasomal degradation and clathrin-mediated endocytosis through proteins CTTN and USP1 but unlikely to influence cell adhesion. 41th FEBS congress; 2016 September 3-8, Kuşadası, Turkey.
17. **Antonenko S**, Gurianov D, Kravchuk I, Telegeev G. Role of USP1, CORTACTIN and HSP27 proteins in molecular mechanisms that affect CML development. International Scientific Conference Normal and cancer stem cells: discovery, diagnosis and therapy; 2017 October 5–6, Kyiv, Ukraine.
18. Gurianov D, **Antonenko S**, Telegeev G. Possible role of PH domain of Bcr in molecular pathways that determine the phenotype of myeloproliferative disorder in Bcr-Abl positive leukemias. LIMSC – 10th Leiden International (Bio) Medical Student Conference; 2017 March 15, Leiden, Netherlands.
19. **Antonenko S**, Gurianov D, Telegeev G. USP1 protein colocalizes with Bcr-Abl oncoprotein in K562 cells and acts as potential target for CML therapy. XI Parnas Conference - Young scientists forum biochemistry and molecular biology for innovative medicine; 2018 September 3-5, Kyiv, Ukraine.
20. **Antonenko S**, Telegeev G. Interaction of USP1 protein and PH domain of Bcr protein and its role in Bcr-Abl evasion from proteasomal degradation. II International Conference Tumor and Host: Novel Aspects of Old Problem; 2019 November 21–22, Kyiv, Ukraine.
21. **Antonenko S**, Polishchuk Y, Telegeev G. ZNF217 protein expression in Bcr-Abl-positive chronic myeloid leukemia cells. XIV Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine; 2020 May 27-28, Kyiv, Ukraine.