

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

**АНТОНЕНКО СВІТЛАНА ВАСИЛІВНА**



УДК 577.2.575

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

03.00.22 – молекулярна генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ - 2020

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ).

Науковий керівник: доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Телегєєв Геннадій Дмитрович**  
Інститут молекулярної біології і генетики  
НАН України,  
завідувач відділу молекулярної генетики.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,  
член-кор. НАН України,  
**Мінченко Олександр Григорович**  
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна  
НАН України,  
завідувач відділу молекулярної біології;  
  
кандидат біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Завелевич Михайло Петрович**  
Інститут експериментальної патології,  
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького  
відділ онкогематології.

Захист відбудеться “24” листопада 2020 року о 10.30. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: вул. Заболотного, 150, м. Київ, 03143.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: вул. Заболотного, 150, 03143, м. Київ.

Автореферат розіслано “ \_\_\_ ” жовтня 2020 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
к.б.н., с.н.с.



І.В. Крупська

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**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 (Flis *et al.*, 2019; Soverini *et al.*, 2018). 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 (Allart-Vorelli *et al.*, 2015; Zhang H *et al.*, 2013; Soverini *et al.*, 2018). 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 (Reckel *et al.*, 2017; Hai *et al.*, 2014; Shet *et al.*, 2002). 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 (Reckel *et al.*, 2017). 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 (Aladag *et al.*, 2019; Jabbour *et al.*, 2013; Flis *et al.*, 2019). Альтернативною стратегією боротьби з ХМЛ є селективне зниження рівня онкобілка Bcr-Abl (Shibata *et al.*, 2020), 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 (Miroshnuchenko *et al.*, 2010).

**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 Bcr-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 Bcr-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 Bcr-Abl із білком USP1 за допомогою домену PH.
5. Дослідити вплив активності деубіквітази USP1 на рівень онкобілка Bcr-Abl у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії людини.
6. Визначити можливість утворення білкового комплексу Bcr-Abl/GLG1 та його локалізацію у клітинах K562, проаналізувати фосфорилування білка GLG1 за сайтами тирозину.
7. Дослідити колокалізацію онкобілка Bcr-Abl і білка ZFP217, а також вплив тирозинкіназної активності онкобілка Bcr-Abl на експресію ZFP217 у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії людини.

**Об'єкт дослідження** – білки партнери онкобілка Bcr-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, коїмунопреципітація, 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 регулювати 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 експресією 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, pECFP-C3-USP1 можуть бути використані для подальшого вивчення функціональних властивостей білка USP1 та його участі у сигнальних шляхах клітини. Адаптовано імунофлуоресцентний 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 перешкождала 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 коїмунопреципітації 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 експресію 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.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

### **Матеріали та методи досліджень**

У роботі було використано антитіла: anti-USP1 (ThermoFisher Scientific, США), anti-Bcr-Abl (Thermo Fisher Scientific), anti-Abl (Sigma, США), anti-GFP (ThermoFisher Scientific, USA), anti-polyHistidine (Sigma, США), anti-GLG1 (ThermoFisher Scientific, США), anti-Golgi Marker (Santa Cruz Biotechnology, США), anti-phosphotyrosine (ThermoFisher Scientific, США), anti-ZNF217 (ThermoFisher Scientific, США), anti-mouse (ABclonal Technology, США), anti-rabbit, DyLight550 (ThermoFisher Scientific, США), anti-mouse, DyLight488 (ThermoFisher Scientific, США). 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). Маркер молекулярних мас Plus Prestained 10 250kDa Protein Ladder (Thermo Scientific). 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). Клітинні лінії E. coli: DH5 $\alpha$  (Stratagene, США), ArcticExpress (DE3), (Agilent Technologies, США). Лінії клітин людини: K562, 293T.

*Створення плазмідних конструкцій.* Кодуючу послідовність гена USP1 ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням праймерів: USP1 fwd (AATTGCCTGGTGTTCATACCTAGTG) та USP1 rev (GAGAGACCAATAATATCCAGTAGC). кДНК USP1 клонували у вектор pUC18 по сайтах SmaI та субклонували у вектори еукаріотичної експресії pCMV-NA та pEGFP-C3 по сайтам KpNI і SalI. Послідовність конструкцій визначали за допомогою секвенування за методом Сенгера на автоматичному секвенаторі «Applied Biosystems 3130» (США).

*Культивування клітинних ліній людини.* Клітини K562 (хронічна мієлоїдна лейкемія людини) та 293T (ембріональна нирка людини) культивували згідно рекомендацій Американського банку культур клітин та тканин (ATCC).

*Трансфекція клітин 293T.* Трансфекцію клітин 293T проводили за допомогою поліетиленіміну (Sigma, США) згідно рекомендацій виробника.

*Експресія рекомбінантних білків.* Для експресії рекомбінантних білків у бактеріальній системі використовували плазмідний вектор рЕТ-28с-РН та плазмідні вектори рСМV-НА-USP1, рЕСFP-С3-USP1 для системи клітин ссавців. Рекомбінантний білок РН експресували у клітинах *E. coli* (штам ArcticExpress - DE3) та очищували за допомогою Ni+NTA агарози (Sigma, США) згідно з рекомендаціями виробника.

*Дослідження білок-білкових взаємодій.* Дослідження білкових взаємодій здійснили за допомогою методів коїмунопреципітацію та пул-даун аналізу. Коїмунопреципітацію було проведено з використанням G-агарози (Sigma, США) та специфічних антитіл. Для отримання результатів шляхом пул-даун аналізу білок кон'югований з Ni+NTA інкубували з лізатами клітин K562. Отримані преципітати вивчали за допомогою вестерн-блот аналізу.

*Біоінформатичний аналіз.* Передбачення сайтів фосфорилування здійснили за допомогою веб-серверів «Disphos1.3», «KinasePhos», «NetPhos 2.0 Server» та «PhosphoPICK». Послідовності білків для аналізу були отримані з баз даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації, США.

*Аналіз рівня онкобілка Vcr-Abl.* Клітини K562 інкубували з 52 нМ та 76 нМ ML323 протягом 24 год. Лізати клітин вивчали допомогою вестерн-блот з використанням антитіл проти Vcr-Abl,  $\beta$  - актин був використаний у якості контролю нанесення зразків.

*Вивчення впливу іматинібу на ZNF217.* Клітини K562 інкубували з 2,5 мМ іматинібу протягом 24 год. Аналіз клітин здійснили за допомогою імунофлуоресцентного аналізу з подальшою конфокальною мікроскопією.

*Дослідження внутрішньоклітинної локалізації білків.* Після культивування у чашках Петрі клітини фіксували 4% розчином формальдегіду. Пермеабілізацію здійснили за допомогою розчину Triton X-100. Неспецифічне зв'язування антитіл пригнічували, інкубуючи зразки у розчині 1% бичачого сироваткового альбуміну. Потім клітини інкубували із специфічними первинними антитілами у відповідному розведенні, промивали та додавали відповідні флуоресцентно мічені вторинні антитіла. Фарбування ядер проводили за допомогою DAPI (ThermoFisher Scientific, США). Препарат на скельцях полімеризували з використанням CitiFluor™ AF1, Mounting Medium «Science Services» (Німеччина) та вивчали за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопу «Zeiss LSM 510 Meta» (Німеччина), з імерсійним об'єктивом 100x1.25 N.A та програмою «LSM Browser».

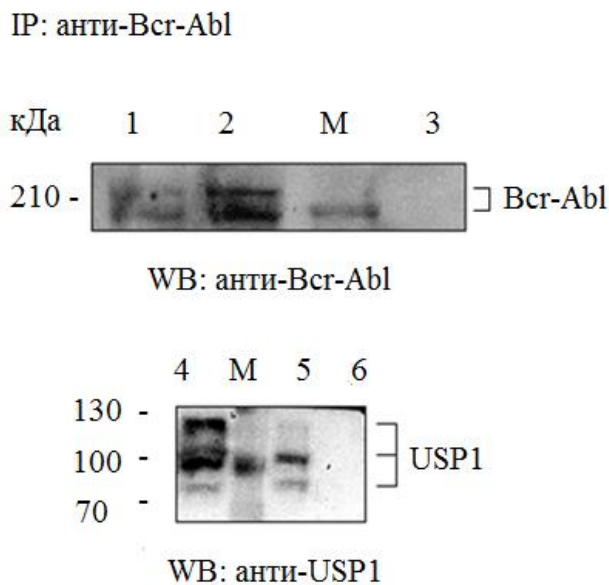
*Аналіз колокалізації білків.* Кількісний аналіз колокалізації між двома білками здійснили з використанням коефіцієнту кореляції Пірсона та коефіцієнту кореляції Мандерса за допомогою програмного забезпечення Fiji ImageJ (плагіна JACoP).

*Статистична обробка даних.* Статистичну обробку результатів здійснили за допомогою програми Excel (MS Office 2010) із використанням t-критерію Стьюдента. Результати експериментів представлені у вигляді середнього арифметичного значення із зображенням стандартного відхилення ( $\pm$ SD).



## Результати досліджень та їх обговорення

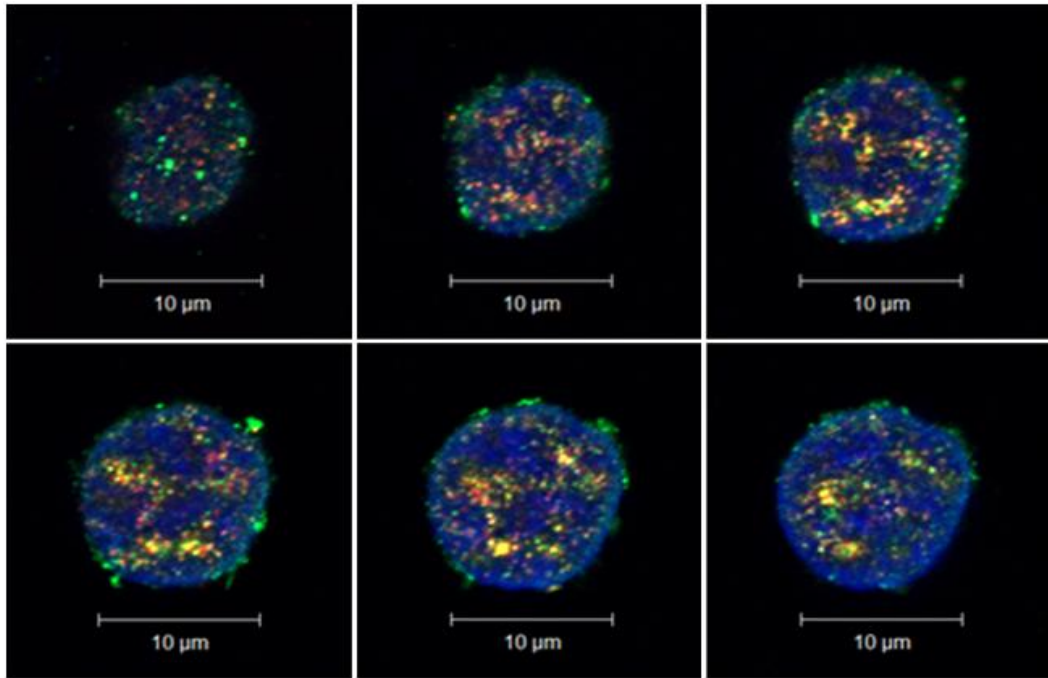
**Ідентифікація та характеристика білкового комплексу Vcr-Abl/USP1 у клітинах ХМЛ.** Експериментальне підтвердження взаємодії онкобілка Vcr-Abl і деубіквітинази USP1 здійснили за допомогою методу коімунопреципітації. Для дослідження було обрано клітинну лінію K562, отриману від хворих ХМЛ на стадії бластного кризу, з конститутивною експресією онкобілка Vcr-Abl. Преципітацію білкових комплексів було проведено з використанням антитіл проти Vcr-Abl та проти Abl. Встановлено, що для клітин K562 характерна наявність трьох ізоформ білка USP1, дві з яких утворюють білковий комплекс з онкобілком Vcr-Abl (рис. 1). Таким чином, вперше виявлено взаємодію між білками Vcr-Abl і USP1 у клітинах ХМЛ.



**Рис. 1. Преципітація ендогенних білків з лізату клітин K562, за допомогою антитіл проти Vcr-Abl: 1 – Vcr-Abl, лізати клітин K562 (контроль); 2 - Vcr-Abl, результати коімунопреципітації; 3, 6 - інкубація агарози лише з лізатами клітин K562 (контроль); 4 - USP1, лізати клітин K562 (контроль); 5 - USP1, результати коімунопреципітації; M – маркер молекулярних мас. IP – імунопреципітація, WB – вестерн блот**

**Колокалізація онкобілка Vcr-Abl і білка USP1 у клітинах ХМЛ.** Можливість формування білкового комплексу Vcr-Abl/USP1 було перевірено за допомогою імуофлуоресцентного аналізу ендогенних білків з подальшою конфокальною мікроскопією. Було показано, що у клітинах K562 білок USP1 має характерну для нього ядерну локалізацію. Шляхом візуального аналізу зображень виявлено перекриття сигналів локалізації для онкобілка Vcr-Abl і білка USP1 у ядрах клітин (рис. 2). Позитивну кореляцію та високий рівень колокалізації між цільовими білками було підтверджено шляхом кількісного аналізу з урахуванням коефіцієнтів Пірсона і Мандерса. Таким чином, вперше встановлено колокалізацію між онкобілком Vcr-Abl і білком USP1 та показано, що формування даного білкового комплексу відбувається в ядрах клітин K562.

**Взаємодія та колокалізація між доменом PH онкобілка Vcr-Abl і білком USP1.** Відомо, що саме PH домен, відіграє важливу роль у формуванні диференційованого інтерактому та фосфопротеому форми p210 Vcr-Abl, впливає на його локалізацію (Reckel *et al.*, 2017). Тому, наступний етап роботи було присвячено експериментальному вивченню взаємодії між USP1 та PH доменом Vcr частини онкобілка Vcr-Abl.

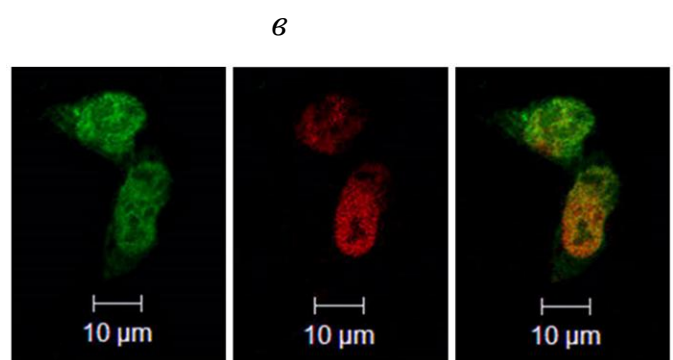
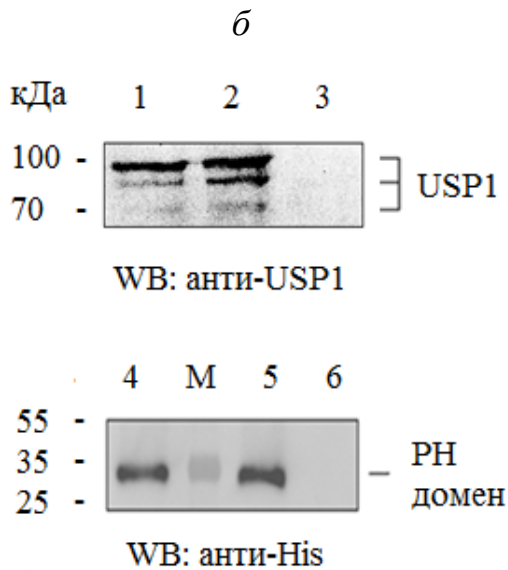
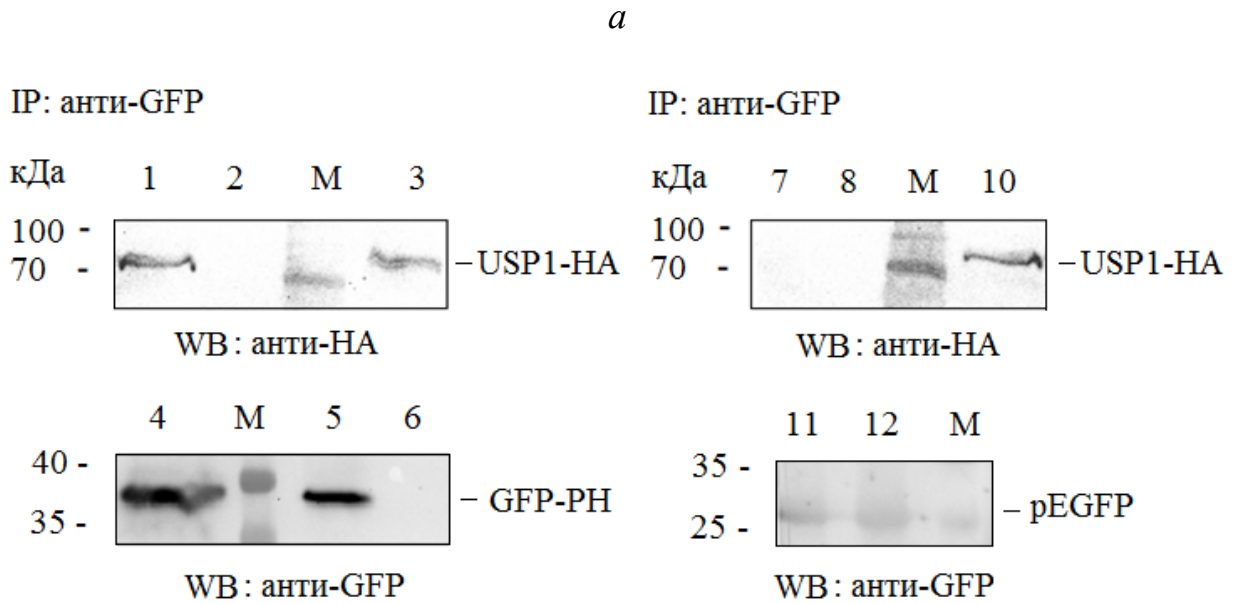


**Рис. 2.** Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної локалізації білка USP1 (червоне) і онкобілка Vcr-Abl (зелене) у клітинах K562, z-стекінг зображення. Ядра дофарбовані барвником DAPI (синє). Перекриття сигналів локалізації (жовте)

Для дослідження взаємодії білків РН і USP1 методом коімунопреципітації, шляхом стандартних молекулярно-генетичних методів було створено плазмідний вектор рCMV-НА-USP1, який котрансфікували з плазмідним вектором рEGFP-РН у клітини 293Т та отримали експресію цільових рекомбінантних білків. Преципітацію білкового комплексу РН/USP1 здійснили з використанням антитіл проти GFP-мітки. Аналіз результатів за допомогою вестерн-блоту підтвердив взаємодію між рекомбінантними білками РН і USP1 (рис. 3а). У контрольному варіанті клітини трансфікували “порожнім” вектором рEGFP. Для вивчення взаємодії РН домену із нативним білком USP1 було використано пул-даун аналіз. З цією метою плазмідний вектор рЕТ-28с-РН експресували у клітинах *E. coli*. Рекомбінантний білок РН-Ніс очистили шляхом афінної хроматографії та інкубували з лізатами клітин K562. Преципітацію білкових комплексів здійснили з використанням антитіл проти Ніс-тагу (рис. 3б). За допомогою вестерн-блот аналізу встановлено, що рекомбінантний домен РН зв’язуються з трьома ізоформами білка USP1, в той час як Vcr-Abl взаємодіє лише із двома ізоформами, що може бути викликано особливостями фолдингу онкобілка, пострасляційними модифікаціями тощо.

Можливості утворення білкового комплексу між білками РН і USP1 з’ясували також і за допомогою конфокальної мікроскопії. З цією метою було створено плазмідний вектор рЕСFP-C3-USP1, який котрансфікували з рmCitrineC1-РН у клітини 293Т. Локалізацію рекомбінантних білків РН і USP1 вивчали за допомогою конфокальної мікроскопії. З’ясовано, що білок РН переважним чином накопичується в ядрі клітин. Шляхом візуального та

кількісного аналізу зображень було показано наявність часткової колокалізації між білками PH і USP1 у ядрі клітин 293Т (рис. 3в).



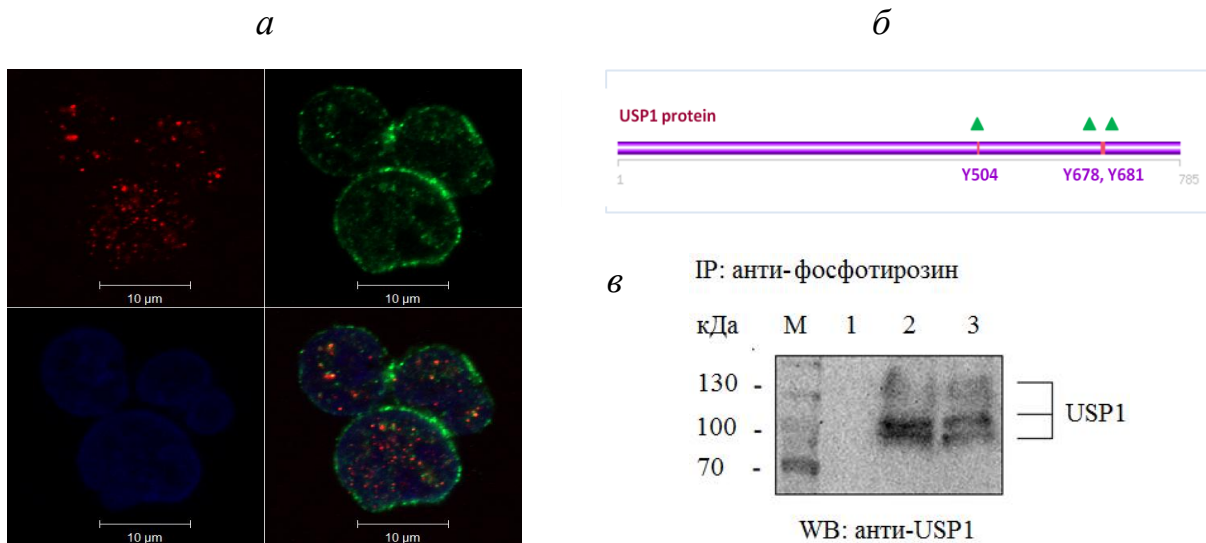
**Рис. 3. Дослідження взаємодії та колокалізації білків USP1 і PH.**

*a* – преципітація білків з лізатів клітин 293Т за допомогою антитіл проти GFP-мітки: USP1-НА, результати преципітації (1), інкубація агарози лише з лізатами клітин 293Т (2, 6, 8), USP1-НА, лізати клітин 293Т, контроль (3, 10), PH-GFP, результати преципітації (4), PH-GFP, лізати клітин 293Т, контроль (5), pEGFP, результати преципітації (11), pEGFP, лізати клітин 293Т, контроль (12); *б* - пул-даун аналіз за допомогою антитіл проти His-тагу: USP1, лізати клітин K562, контроль (1), USP1, результати пул-даун аналізу (2), інкубація агарози лише з лізатами клітин K562 (3, 6), PH-His домен, контроль (4), PH-His домен, результати пул-даун аналізу (5), М – маркер молекулярних мас, IP – імунопреципітація, WB – вестерн блот; *в* - імунофлуоресцентний аналіз локалізації рекомбінантних білків PH (зелене) та USP1 (червоне) у клітинах 293Т. Перекриття сигналів локалізації (жовте)

З літератури відомо, що розпізнавання білка субстрату деубіквітиназами відбувається шляхом селективного зв'язування з доменами цільового білка чи за рахунок білків-адаптерів. У роботі вперше експериментальним чином встановлено, що специфічне зв'язування між білками Vcr-Abl/USP1 реалізується шляхом прямої взаємодії деубіквітинази USP1 із PH доменом Vcr частини онкобілка.

**Визначення фосфорильованих форм білка USP1 у клітинах K562.**

Однією з головних властивостей онкобілка Vcr-Abl є неконтрольоване фосфорилування своїх білків-партнерів, тому після виявлення білкового комплексу Vcr-Abl/USP1 увагу було зосереджено на дослідженні фосфорильованих форм білка USP1 у клітинах K562. Згідно даних біоінформатичного аналізу найбільшу імовірність фосфорилування на білкові USP1 мають Y504, Y678, Y681 тирозинові сайти (рис. 4). Експериментальне виявлення фосфорильованих форм білка USP1 здійснили за допомогою методу коімунопреципітації та імуофлуоресцентного забарвлення ендогенних білків з подальшою конфокальною мікроскопією. Преципітацію білкових комплексів виконали з використанням антитіл проти фосфотирозину. Аналіз результатів підтвердив наявність фосфорильованих форм USP1 у клітинах K562. Найбільш чітко на блотограмі проявилися дві ізоформи білка USP1, які взаємодіють з онкобілком Vcr-Abl.



**Рис. 4. Аналіз фосфорильованих форм білка USP1 у клітинах K562: а** – імуофлуоресцентне забарвлення клітин: USP1 (червоне), білки фосфорильовані за тирозином (зелене), ядра дофарбовані барвником DAPI (синє), перекриття сигналів локалізації (жовте); **б** – схема розташування тирозинових сайтів на білкові USP1, результати біоінформатичного аналізу; **в** – преципітації білків за допомогою антитіл проти фосфотирозину: інкубація агарози лише з лізатами клітин K562 (1), USP1, результати преципітації (2), USP1, лізати клітин K562, контроль (3), М – маркер молекулярних мас, IP – імуопреципітація, WB – вестерн блот

Таким чином, отримані результати дають підстави вважати, що пострасляційна модифікація білка USP1 у вигляді фосфорилування, може бути одним із наслідків утворення білкового комплексу Src-Abl/USP1, призводити до дерегуляції його функціональних властивостей та порушенням балансу між процесами убіквітинування/деубіквітинування у клітинах K562.

**Дослідження впливу деубіквітинази USP1 на онкобілок Src-Abl.** Відомо, що продукти синтезу злитих генів мають руйнуватися за рахунок механізмів контролю якості білків, проте у злоякісних клітинах існують механізми пригнічення деградації онкобілків, основну роль у цьому процесі виконують деубіквітинази. Тому наступний підрозділ роботи було присвячено дослідженню впливу деубіквітинази USP1 на локалізацію та рівень онкобілка Src-Abl у клітинах ХМЛ. Ферментативну активність USP1 у клітинах K562 пригнічували за допомогою потужного селективного інгібітору ML323 протягом 24 год. Аналіз результатів здійснили за допомогою імунофлуоресцентного аналізу з подальшою конфокальною мікроскопією. Було детектовано, що під впливом ML323 білок USP1 змінює характерну для нього ядерну локалізацію на цитоплазматичну. Запропоновано гіпотетичну модель, згідно якої детектовані зміни відбуваються за рахунок порушення білкового комплексу USP1 із кофактором UAF1, оскільки вважається, що саме він забезпечує націлення білка USP1 на його ядерні субстрати. Шляхом візуального та кількісного аналізу зображень було встановлено, що під впливом інгібітору ML323 знижується рівень колокалізації онкобілка Src-Abl і білка USP1 у клітинах ХМЛ (рис. 5). Показано, що найнижчий рівень колокалізації виявлений через 3 год. інкубації із ML323, так коефіцієнт кореляції Пірсона знижувався із 0,63 до 0,23 у порівнянні з контролем, а коефіцієнт колокалізації Мандерса M1 з 0,91 до 0,44 та M2 з 0,58 до 0,05, у порівнянні з контролем, що свідчить про майже повну відсутність перекриття сигналів локалізації для цільових білків. Через 12-24 год. високі показники колокалізації між білками Src-Abl і USP1 відновлювалися, проте білки зберігали цитоплазматичну локалізацію. Для визначення залежності між активністю деубіквітинази USP1 та рівнем онкобілка Src-Abl, було досліджено лізати K562 після 1,5 год., 3 год., 6 год, 12 год. і 24 год. інкубації з інгібітором ML323. Аналіз результатів за допомогою вестерн-блоту показав зниження рівня онкобілка уже в перші години експерименту (рис. 6a). Найнижчі показники спостерігалися через 3 год. у порівнянні з контролем. Слід відмітити, що низький рівень онкобілка Src-Abl корелював із зниженням колокалізації білків Src-Abl/USP1. На 6 год. експерименту рівень онкобілка Src-Abl починає зростати і до 12-24 год. досягає показників контролю, що може бути пов'язано із втратою функціональних властивостей інгібітору ML323. Крім того, з літератури відомо, що каталітична активність деубіквітинази USP1 регулюється й іншими, UAF1 незалежними чинниками, зокрема, процесом фосфорилування. Опираючись на отримані у роботі дані про активне фосфорилування деубіквітинази у клітинах K562, було висунуто припущення, що після зниження активності ML323, тирозин-кіназна активність онкобілка Src-Abl може бути додатковим фактором активації USP1.

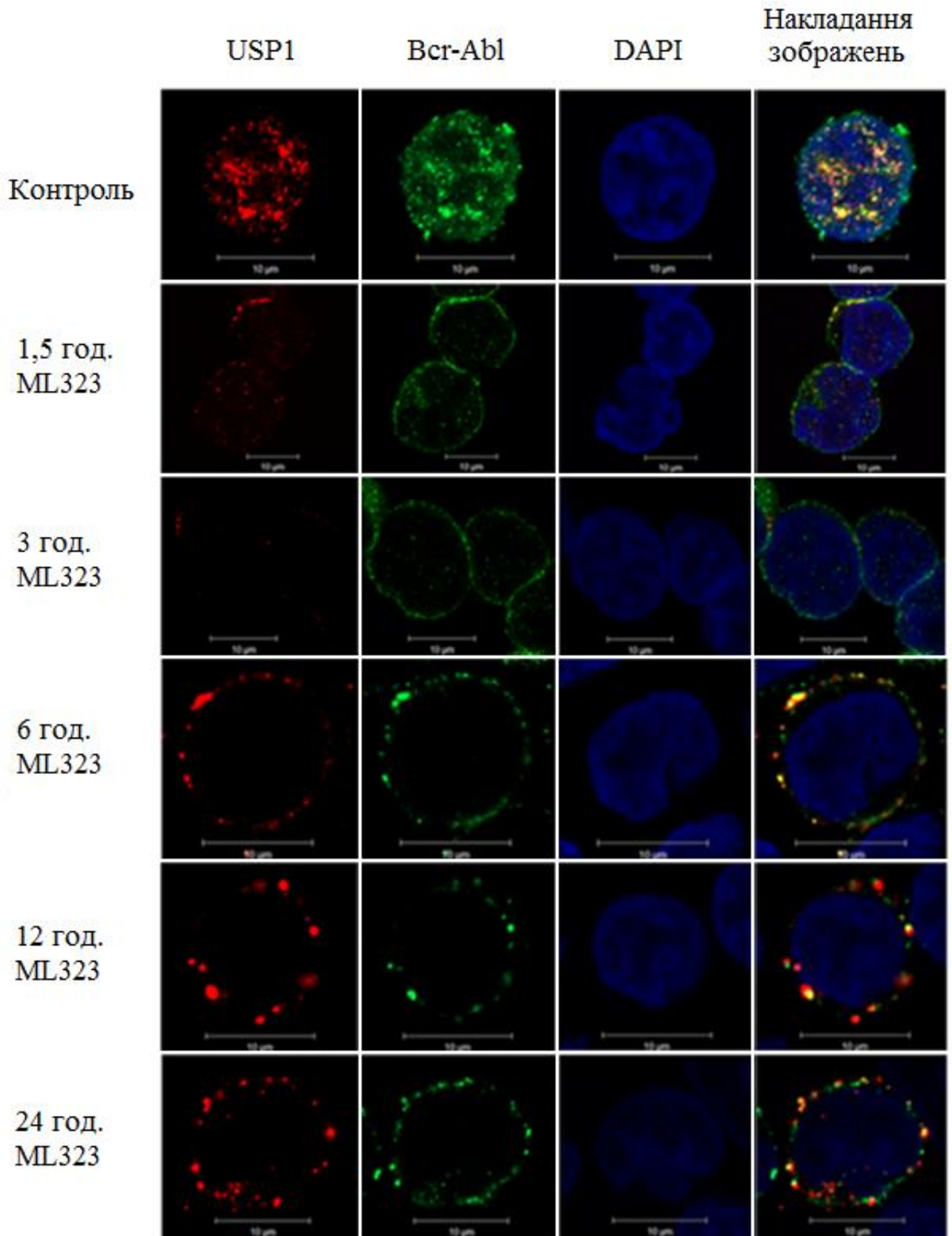
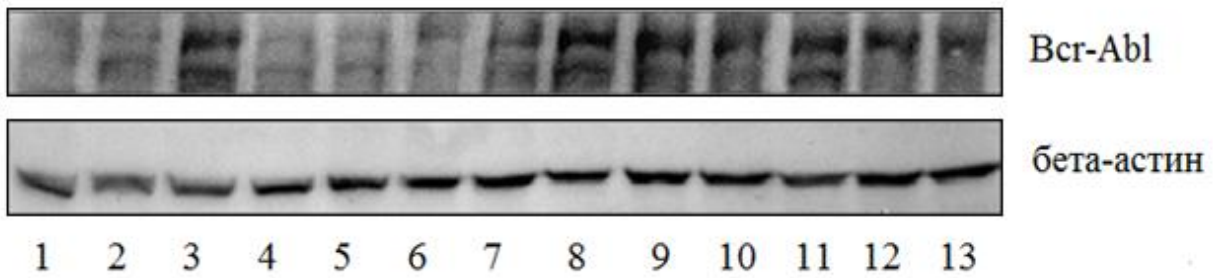


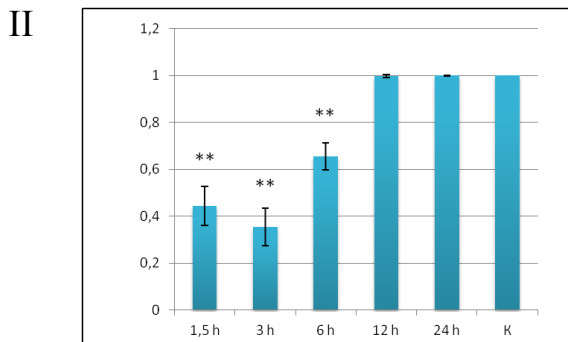
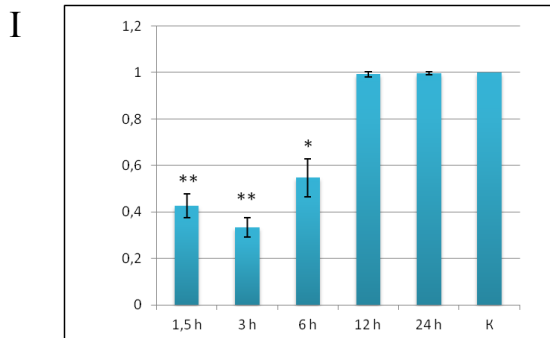
Рис. 5. Імунофлуоресцентний аналіз клітин K562 після інкубація з 76 нМ ML323. Білок USP1 (червоне), онкобілок Bcr-Abl (зелене). Ядра клітин дофарбовані ДНК-зв'язувальним барвником DAPI (синє). Перекриття сигналів локалізації білків Bcr-Abl і USP1 (жовте)

При цьому деубіквітіназа USP1 продовжує зберігати свою цитоплазматичну локалізацію, оскільки сайт зв'язування з білком UAF1, який визначає його ядерну локалізацію, заблокований за допомогою інгібітора ML323. Ще одним поясненням зростання кількості онкобілка Bcr-Abl у даному експерименті може бути протеосомне перевантаження, викликане нездатністю переробляти

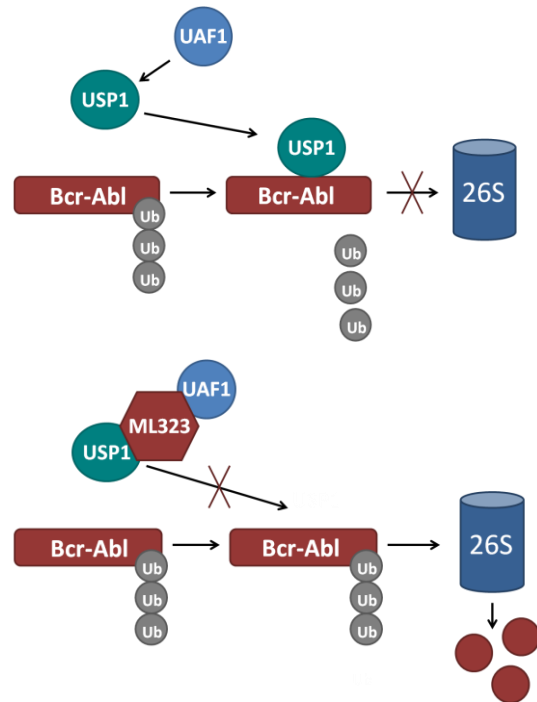
*a*



*б*



*в*

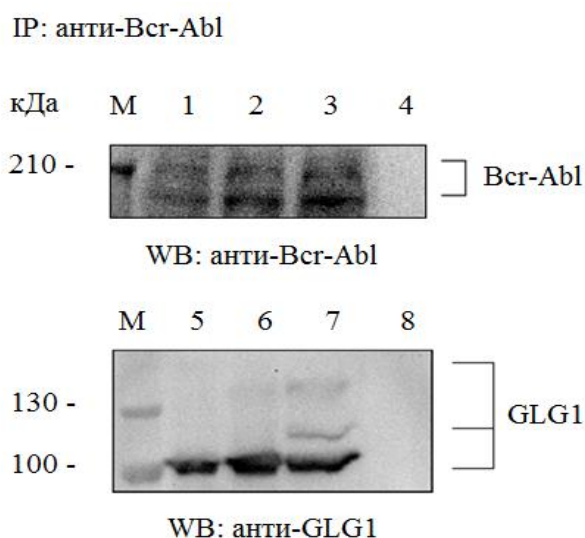


**Рис. 6. Вплив деубіквітінази USP1 на онкобілок Bcr-Abl: *a* – аналіз рівня онкобілка Bcr-Abl у клітинах K562 після інкубації з 52 nM ML323 (1 – 1.5 год; 4 – 3 год; 6 – 6 год; 9 – 12 год; 12 – 24 год) та 76 nM ML323 (2 – 1.5 год; 5 – 3 год; 7 – 6 год; 10 – 12 год; 13 – 24 год), лізати клітин K562, контроль (3, 8, 11); *б* – результати статистичного аналізу рівня онкобілка Bcr-Abl після інкубації з інгібітором ML323 (I - 52 nM, II - 76 nM ML323). Значення  $p < 0,05$  вважали статистично значущим; *в* – гіпотетична модель протеосомної деградації онкобілка Bcr-Abl у клітинах ХМЛ до (I) та після (II) інгібування активності деубіквітінази USP1 за допомогою ML323**

аномально велику кількість неправильно складеного білка, що характерно для злоякісних клітин, в тому числі і Ph-позитивної ХМЛ.

Таким чином, вперше показано, що інгібування активності деубіквітинази USP1 супроводжується порушенням колокалізації білків Vcr-Abl/USP1 та призводить до зниження рівня онкобілка Vcr-Abl у клітинах ХМЛ. Враховуючи отримані дані було запропоновано модель згідно якої білок USP1 шляхом деубіквітинуючої активності запобігає протеосомній деградації онкобілка Vcr-Abl та є перспективною терапевтичною мішенню при терапії ХМЛ (рис. 6в).

**Взаємодія онкобілка Vcr-Abl з білком GLG1.** Наступний підрозділ роботи було присвячено вивченню білкового комплексу Vcr-Abl/GLG1 за допомогою методу коімунопреципітації у клітинах K562. Білкові преципітати отримали з використанням антитіл проти Vcr-Abl. Візуалізацію результатів здійснили за допомогою методу вестерн блот (рис. 7).

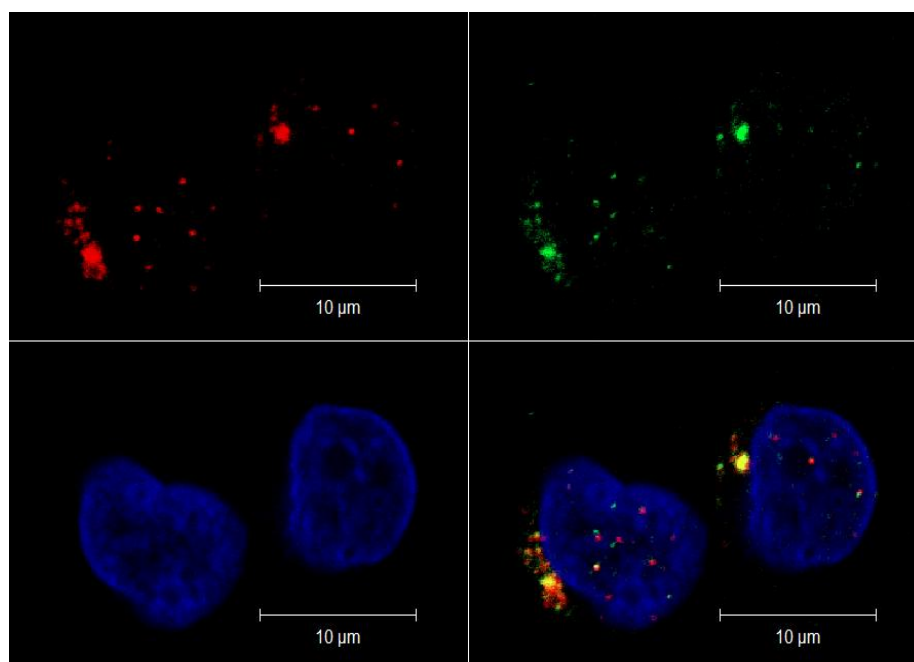


**Рис. 7. Преципітація**  
ендогенних білків з лізату клітин K562, за допомогою антитіл проти Vcr-Abl: 1 - Vcr-Abl, лізати клітин K562 (контроль); 2, 3 - Vcr-Abl, результати преципітації; 4, 8 - інкубація агарози лише з лізатами клітин K562; 5, 6 - білок GLG1, результати преципітації  
М - маркер молекулярних мас,  
IP - імунопреципітація,  
WB - вестерн блот

Аналіз результатів показав, для клітин K562 характерна наявність усіх трьох ізоформ білка GLG1 при цьому лише одна із них утворює комплекс із онкобілком Vcr-Abl. Причиною, цьому може бути альтернативний сплайсинг, який, як вважається, регулює функції ізоформ GLG1, а отже призводить до зміни молекулярних зв'язків, участі білка у сигнальних шляхах тощо. Таким чином, вперше було встановлено білок-білкову взаємодію між Vcr-Abl і GLG1 у клітинах ХМЛ.

**Колокалізація білків Vcr-Abl/GLG1 у комплексі Гольджі.** Відомо, що локалізація білка GLG1 залежить від типу клітин, а тому він може зустрічатися як на мембрані клітин, так і у комплексі Гольджі. Локалізацію білка GLG1 у клітинах K562 було вивчено за допомогою імунофлуоресцентного забарвлення з використанням антитіл проти GLG1. Маркерні сигнали локалізації отримали за допомогою антитіла, специфічного до комплексу Гольджі. Візуалізацію результатів здійснили методом конфокальної мікроскопії. Таким чином, було з'ясовано, що в клітинах K562 білок GLG1 локалізується у комплексі Гольджі (рис. 8), що є характерною ознакою злоякісних клітин.





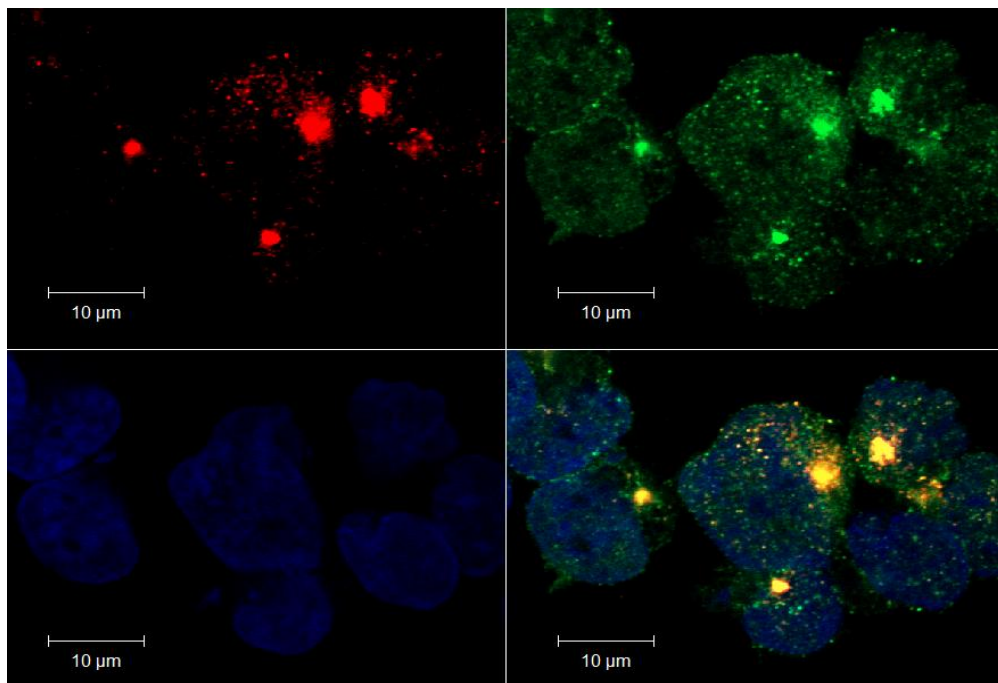
**Рис. 8.** Імунофлуоресцентний аналіз локалізації білка GLG1 (червоне) у клітинах K562. Комплекс Гольджі (зелене), ядра дофарбовані барвником DAPI (синє). Перекриття сигналів локалізації (жовте)

Для більш детального аналізу комплексу між білками Vcr-Abl і GLG1 було вивчено їх розподіл у клітинах K562 шляхом імунофлуоресцентного методу. Таким чином, було встановлено наявність перекриття сигналів локалізації білка GLG1 і онкобілка Vcr-Abl у комплексі Гольджі (рис. 9). Високий рівень колокалізації білків Vcr-Abl/GLG1 було підтверджено за допомогою візуального та кількісного аналізу з урахуванням коефіцієнта кореляції Пірсона та коефіцієнта колокалізації Мандерса. Припускається, що утворений білковий комплекс Vcr-Abl/GLG1 є досить стабільним протягом всього клітинного циклу, оскільки зафіксована під час інтерфази колокалізація онкобілка Vcr-Abl і білка GLG1 незмінно зберігається і під час поділу клітин K562. Отже, вперше виявлено колокалізацію між онкобілком Vcr-Abl і білком GLG1 та з'ясовано, що утворення білкового комплексу Vcr-Abl/GLG1 відбувається у комплексі Гольджі Ph-позитивних клітин ХМЛ.

**Дослідження фосфорильованих форм GLG1 у клітинах K562.** Утворення білкового комплексу Vcr-Abl/GLG1 є передумовою вважати, що білок GLG1 може бути дерегульованим за рахунок тирозинкіназної активності онкобілка Vcr-Abl. Шляхом біоінформатичного аналізу було спрогнозовано тирозинові сайти фосфорилування для білка GLG1 (рис. 10а). Так, для ізоформи 1 і 3, найбільшу вірогідність фосфорилування мають сайти Y823, Y878, а для ізоформи 2 – Y812, Y867. Для експериментального підтвердження наявності фосфорильованого за тирозином білка GLG1 у клітинах K562 було використано метод коімунопреципітації (рис. 10б) із застосуванням антитіл проти фосфотирозину. Аналіз преципітатів показав наявність фосфорильованої за тирозином ізоформи білка GLG1 у клітинах K562. Цікаво, що

фосфорильованою була ізоформа білка GLG1 з найменшою молекулярною масою, тобто саме та ізоформа, яка взаємодіє з онкобілком Vcr-Abl.

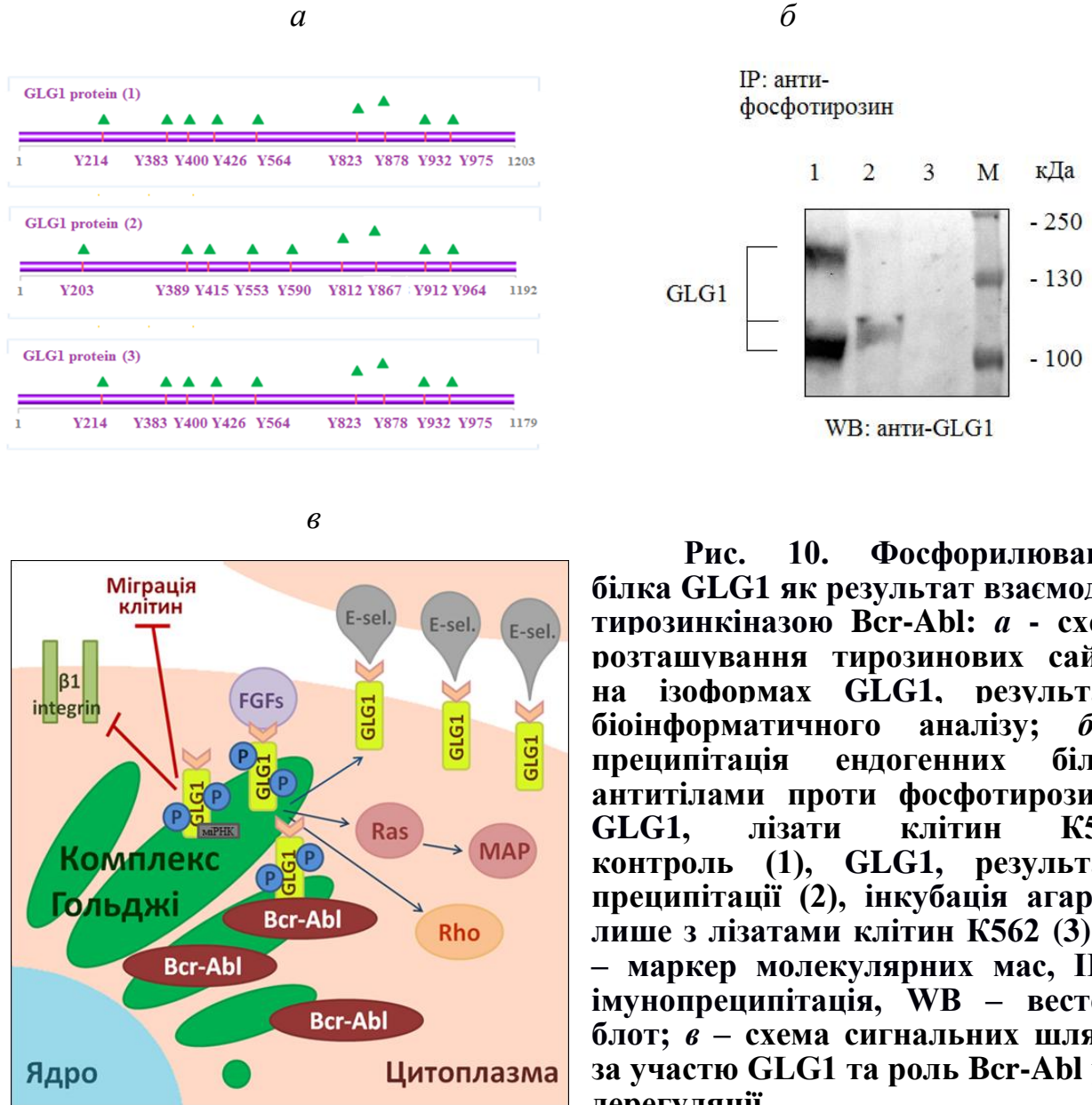
З літератури відомо, білок GLG1 займає привілейоване положення у секреторних шляхах клітини, серед яких найбільш вивченою є його участь у активації Ras-MAP кіназного каскаду, білків родини Rho, взаємодія з E-селектином, факторами росту фібробластів, а його суперекспресія сприяє метастазуванню (Planche *et al.*, 2012). Було запропоновано гіпотетичну теорію (рис. 10в) згідно якої під час утворення білкового комплексу Vcr-Abl/GLG1 в апараті Гольджі, онкобілок Vcr-Abl шляхом фосфорилування дерегулює властивості GLG1, що викликає порушення низхідних сигнальних шляхів та впливає на процеси рухливості, адгезії, міграції клітин.



**Рис. 9. Імунофлуоресцентний аналіз локалізації білка GLG1 (червоне) і онкобілка Vcr-Abl (зелене) у клітинах K562. Ядра дофарбовані барвником DAPI (синє). Перекриття сигналів локалізації (жовте)**

**Колокалізація онкобілка Vcr-Abl і білка ZNF217 у клітинах K562.** Передумовою вивчення колокалізації онкобілка Vcr-Abl із білком ZNF217 стали результати мас-спектрометричного аналізу (Miroshnychenko *et al.*, 2010), які визначили транскрипційний фактор ZNF217 потенційним партнером онкобілка. З цією метою клітини ХМЛ вивчали за допомогою імунофлуоресцентного забарвлення з подальшою конфокальною мікроскопією. Було показано, що у клітинах K562 білок ZNF217 має характерну для нього ядерну локалізацію. Результати візуального та кількісного аналізу з урахуванням коефіцієнта кореляції Пірсона та коефіцієнта кореляції Мандерса виявили високий рівень перекриття сигналів локалізації для онкобілка Vcr-Abl і білка ZNF217, що свідчить про їх колокалізацію (рис. 11а). Експериментальне підтвердження колокалізації білків Vcr-Abl/ZNF217 є необхідною умовою подальшого

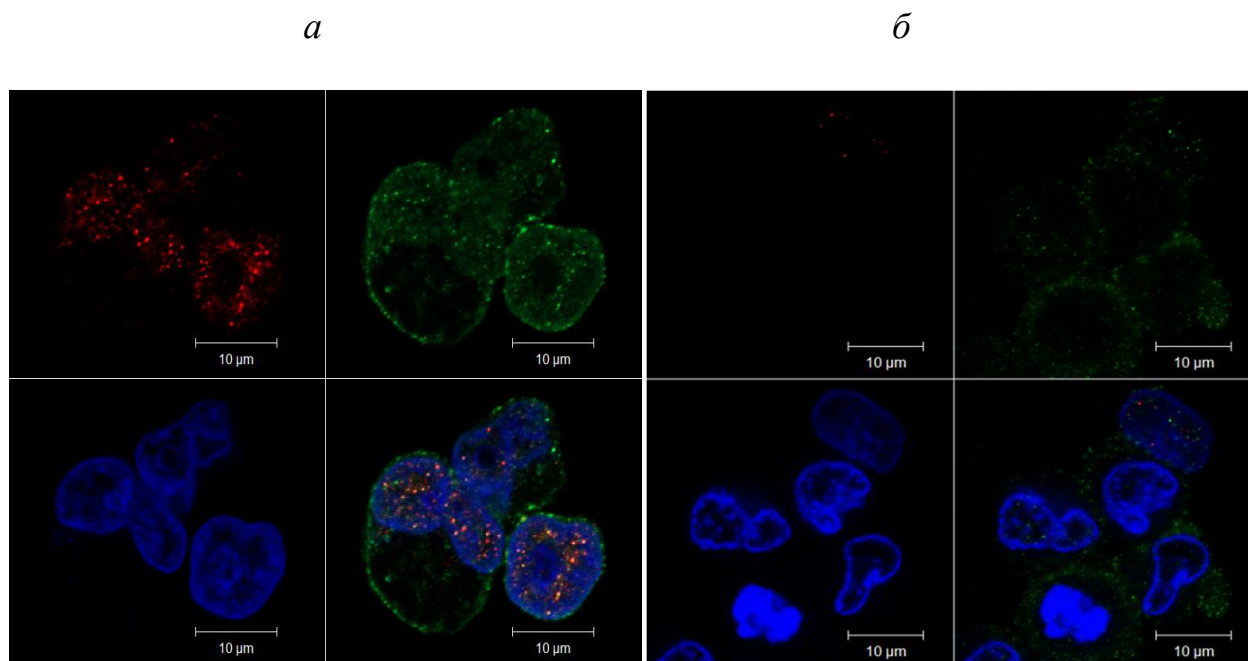
вивчення ролі ZNF217 в етіології розвитку ХМЛ. Дані про колокалізацію можуть свідчити про пряму чи опосередковану через білки-адаптери взаємодію між білками Bcr-Abl і ZNF217, їх участь у спільних сигнальних каскадах, виконанні функцій тощо.



**Рис. 10. Фосфорилування білка GLG1 як результат взаємодії з тирозинкіназою Bcr-Abl: а - схема розташування тирозинових сайтів на ізоформах GLG1, результати біоінформатичного аналізу; б - преципітація ендогенних білків антитілами проти фосфотирозину: GLG1, лізати клітин K562, контроль (1), GLG1, результати преципітації (2), інкубація агарози лише з лізатами клітин K562 (3), М – маркер молекулярних мас, IP – імунопреципітація, WB – вестерн блот; в – схема сигнальних шляхів за участю GLG1 та роль Bcr-Abl у їх дерегуляції**

**Вплив кіназної активності онкобілка Bcr-Abl на експресію білка ZNF217 у клітинах K562.** Відомо, що близько 80% білків цинкового пальця регулюються шляхом фосфорилування, білок ZNF217 не є виключенням, порушення цього процесу впливає на дерегуляцію контактів між білком ZNF217 і молекулами ДНК під час мітозу, впливає на диференціацію, розвиток органів і тканин (Jen *et al.*, 2016), тому дерегуляція цих процесів створює передумови для розвитку злоякісної трансформації клітин. У дисертаційній роботі було досліджено вплив онкобілка Bcr-Abl на ZNF217 у клітинах ХМЛ. Для цього клітини K562 протягом 24 год. інкубували із іматинібом, відомим

інгібітором тирозинкінази, який використовується як препарат першої лінії при лікуванні ХМЛ. Результати вивчали шляхом імунофлуоресцентного аналізу з подальшою конфокальною мікроскопією. Таким чином, було встановлено, що інгібування кіназної активності онкобілка Bcr-Abl супроводжується зниженням чи повною відсутністю експресії білка ZNF217 у клітинах K562 (рис. 11б). Припускається, що білок ZNF217 може бути одним із тих білків-партнерів, завдяки якому онкобілок Bcr-Abl порушує проліферацію, диференціацію проліферацію та антиапоптичну відповідь тощо. Отже, у роботі вперше детектовано колокалізацію між білками Bcr-Abl і ZNF217 та встановлено вплив тирозинкіназної активності Bcr-Abl на рівень експресії ZNF217 у клітинах K562. Отримані результати є важливими для подальшого вивчення ролі білка ZNF217 як перспективної терапевтичної мішені при розвитку і прогресуванні Ph-позитивної ХМЛ.



**Рис. 11. Імунофлуоресцентний аналіз експресії білка ZNF217 у клітинах K562 до (а) та після (б) дії іматинібу: білок ZNF217 (червоне), онкобілка Bcr-Abl (зелене). Ядра дофарбовані барвником DAPI (В, синє). Перекриття сигналів локалізації (жовте)**

Таким чином, виявлені та охарактеризовані у дисертаційній роботі білкові комплекси Bcr-Abl/USP1, Bcr-Abl/GLG1, Bcr-Abl/ZNF217 поглиблюють розуміння про сигнальні шляхи включені у розвиток та прогресування Ph-позитивної ХМЛ та створюють передумови для розробки нових альтернативних методів лікування спрямованих на нові білки-мішені, які будуть здатними забезпечувати селективну деградацію Bcr-Abl, а не лише пригнічуватимуть його тирозинкіназну активність, навіть у випадку мутаційної мінливості онкобілка.

## ВИСНОВКИ

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

1. Клоновано кодуючу 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 *Vcr-Abl* із фосфорильованими за сайтами тирозину ізоформами *USP1* у клітинах K562, встановлено, що утворення білкового комплексу *Vcr-Abl/USP1* відбувається в ядрі клітин.
4. Шляхом коімунопреципітації та пул-даун аналізу з'ясовано, що онкобілок *Vcr-Abl* взаємодіє із *USP1* за допомогою домену PH.
5. Встановлено, що інгібування активності деубіквітинази *USP1* впливає на рівня онкобілка *Vcr-Abl* у клітинах K562 та запропоновано гіпотетичну модель убіквітин-протеосомної деградації онкобілка *Vcr-Abl* при ХМЛ.
6. Виявлено взаємодію онкобілка *Vcr-Abl* і *GLG1* у комплексі Гольджі клітин ХМЛ, показано, що ізоформа білка *GLG1*, яка утворює комплекс з онкобілком *Vcr-Abl* є фосфорильованою за сайтами тирозину.
7. Продемонстровано ядерну колокалізацію онкобілка *Vcr-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.

## ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Гур'янов Д, Лисецька Т, Кравчук І, **Антоненко С**, Телегеев Г. Роль домену PH білка *VCR* у клітинних процесах, що визначають фенотип Ph-позитивних мієлопроліферативних захворювань. Фактори

- експериментальної еволюції організмів. 2014;15:44-48. *(Особистий внесок: створення генетичної конструкції pUC18-USP1, участь у підготовці рукопису до друку).*
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. *(Особистий внесок: біоінформатичний аналіз ізоформ білка USP1, отримання генетичних конструкцій, підготовка рукопису до друку).*
  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. *(Особистий внесок: культуральна робота, трансфекція плазмідних векторів, конфокальна мікроскопія, аналіз локалізації та колокалізації білків, підготовка рукопису до друку).*
  4. **Антоненко С**, **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. *(Особистий внесок: створення генетичних конструкцій, підготовка рукопису до друку).*
  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. *(Особистий внесок: культуральна робота, трансфекція плазмідних векторів, конфокальна мікроскопія, аналіз локалізації та колокалізації білків, підготовка рукопису до друку).*
  6. **Антоненко С**, Поліщук Ю, Телегеев Г. Фосфорилування сайтів Туг білка USP1 у клітинах K562 як фактор прогресії хронічної мієлоїдної лейкемії. Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. 2019;17(2):249-255. *(Особистий внесок: біоінформатичний аналіз, культуральна робота, імунофлуоресцентний аналіз, коімунопреципітація, вестерн блот, конфокальна мікроскопія, аналіз локалізації та колокалізації білків, підготовка рукопису до друку).*
  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. *(Особистий внесок: культуральна робота, коімунопреципітація, вестерн блот, імунофлуоресцентний аналіз, конфокальна мікроскопія, аналіз локалізації та колокалізації білків, біоінформатичний аналіз, визначення фосфорильованих форм, підготовка рукопису до друку).*
  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. *(Особистий внесок: культуральна робота, коімунопреципітація, вестерн блот, імунофлуоресцентний аналіз, конфокальна мікроскопія, колокалізації білків, визначення рівня Bcr-Abl, статистичний аналіз, підготовка рукопису до друку).*
  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.

## 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.*

Робота присвячена вивченню нових молекулярних взаємодій онкобілка Bcr-Abl із білками USP1, GLG1, ZNF217 та визначенню їх ролі у молекулярно-генетичних механізмах розвитку та прогресування Ph-позитивної хронічної мієлоїдної лейкемії. Встановлено можливий вплив неконтрольованої тирозин кіназної активності Bcr-Abl на функціональні властивості білків партнерів USP1, GLG1, ZFP217. Показано вплив активності деубіквітинази USP1 на рівень онкобілка Bcr-Abl у клітинах ХМЛ. Отримані результати є важливими для подальшого вивчення етіології хронічної мієлоїдної лейкемії та розробки нової стратегії лікування, спрямованої на білки-мішені, здатні 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.

## 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.*

Chronic myeloid leukemia (CML) cytogenetic marker is the Philadelphia 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. 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. An alternative approach to treat CML is the selective reduction of the oncoprotein level, which provides a thorough understanding of molecular rearrangements, signaling cascades 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. 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. In the dissertation, it was first demonstrated that inhibition of the functional properties of USP1 deubiquitinase correlates with a decreased level of Bcr-Abl oncoprotein in CML cells. This decrease coincides in time with the decrease or complete disappearance of Bcr-Abl/USP1 colocalization in K562 cells. For the first time, it has been experimentally confirmed that inhibition of USP1/UAF1 protein complex formation by ML323 shifts USP1 localization from nuclear to cytoplasmic. A hypothetical model was proposed, suggesting that USP1 by its deubiquitination activity prevents proteasomal degradation of Bcr-Abl oncoprotein. Therefore, USP1 seems to be a promising therapeutic target in CML treatment.

The direct interaction of the Bcr-Abl oncoprotein with GLG1 protein in K562 cells was also demonstrated. 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. 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 to impairment of downstream signaling pathways and creating 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.

Thus, in the dissertation, the interactions between the Bcr-Abl oncoprotein with USP1, GLG1 proteins, and colocalization with ZFP217 protein in Ph-positive cells of CML 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 CML 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.