

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20__ р.

**КОМПЛЕКСНИЙ АНАЛІЗ МОЛЕКУЛЯРНИХ МЕХАНІЗМІВ
РЕГУЛЯЦІЇ DLC1 ЗА BCR-AVL-ПОЗИТИВНОЇ ХРОНІЧНОЇ
МІЄЛОЇДНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ**

Випускна кваліфікаційна робота
магістра денної форми навчання
за спеціальністю Біологія та біохімія
Ніщенко Дар’ї Олександрівни

Науковий керівник від кафедри
канд. біол. наук, доц. Синельник Т. Б.

Робота виконана у відділі молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України під керівництвом канд. біол. наук, ст. наук. співроб. Антоненко Світлани Василівни

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГДФ	– гуанозиндифосфат;
ГТФ	– гуанозинтрифосфат;
ДМСО	– диметилсульфоксид;
ІТК	– інгібітори тирозинкінази;
К562	– клітинна лінія BCR-ABL-позитивної хронічної мієлоїдної лейкемії людини;
ХМЛ	– хронічна мієлоїдна лейкемія;
ABL1	– Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 (гомолог 1 онкогену вірусу мишачої лейкемії Абельсона);
АТАС-seq	– assay for transposase-accessible chromatin with sequencing (метод секвенування для виявлення відкритих ділянок хроматину);
BCR-ABL	– breakpoint cluster region – Abelson murine leukemia viral oncogene (химерний онкогенний білок при ХМЛ);
BED	– browser extensible data (формат файлу геномних координат);
BSA	– bovine serum albumin (бичачий сироватковий альбумін);
cCRE	– candidate cis-regulatory elements (кандидатні цис-регуляторні елементи);
CD34	– cluster of differentiation 34 (кластер диференціації 34);
CDK5	– cyclin-dependent kinase 5 (циклін-залежна кіназа 5);
ChIP-seq	– chromatin immunoprecipitation sequencing (хроматинова імунопреципітація з наступним секвенуванням);
ChromHMM	– chromatin hidden Markov model (модель прихованого ланцюга Маркова для сегментації хроматинових станів);
CML-AP	– chronic myeloid leukemia, accelerated phase (хронічна

- мієлоїдна лейкемія, акселерована фаза);
- CML-BC – chronic myeloid leukemia, blast crisis (хронічна мієлоїдна лейкемія, бластний криз);
- CML-CP – chronic myeloid leukemia, chronic phase (хронічна мієлоїдна лейкемія, хронічна фаза);
- CTCF – CCCTC-binding factor (CCCTC-зв'язувальний фактор);
- DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-діамідино-2-феніліндол);
- DGIdb – drug-gene interaction database (база даних взаємодій препаратів і генів);
- DLC1 – deleted in liver cancer 1 (ген/білок, делетований при раку печінки 1);
- DNase-seq – DNase I hypersensitive sites sequencing (секвенування сайтів гіперчутливості до ДНКазы I);
- ENCODE – encyclopedia of DNA elements (енциклопедія ДНК-елементів);
- ERK – extracellular signal-regulated kinase (кіназа, що регулюється позаклітинними сигналами);
- EZH2 – enhancer of zeste homolog 2 (підсилювач гомолога zeste 2);
- FDR – false discovery rate (рівень хибних відкриттів);
- GAP – GTPase-activating protein (білок, що активує ГТФазу);
- GEF – guanine nucleotide exchange factor (фактор обміну гуанінових нуклеотидів);
- GENCODE – genome annotation consortium (проект комплексної анотації геному людини та миші);
- GEO – gene expression omnibus (відкритий репозиторій даних про експресію генів NCBI);
- GO – gene ontology (ієрархічна онтологія для анотації генів і їхніх продуктів);

HECTD1	– HECT domain E3 ubiquitin protein ligase 1 (E3-убіквітинлігаза з HECT-доменом 1);
HSPC	– hematopoietic stem and progenitor cells (гемопоетичні стовбурові та прогеніторні клітини);
IDR	– irreproducibility discovery rate (статистичний фільтр відтворюваності піків між реплікатами ChIP-seq);
IGV	– integrative genomics viewer (інструмент для інтерактивної візуалізації геномних даних);
IQR	– interquartile range (міжквартильний розмах);
JACoP	just another colocalization plugin (плагін для кількісної оцінки рівня колокалізації білків);
KEGG	– Kyoto encyclopedia of genes and genomes (Кіотська база даних генів і геномів);
KLIFS	– kinase-ligand interaction fingerprints and structures (база даних взаємодій кіназ з лігандами);
MCL	– Markov clustering algorithm (алгоритм кластеризації мереж на основі марківських ланцюгів);
NBM	– normal bone marrow (нормальний кістковий мозок);
NES	– nuclear export signal (сигнал ядерного експорту);
PBS	– phosphate-buffered saline (фосфатно-сольовий буфер);
PCC	– Pearson correlation coefficient (коефіцієнт кореляції Пірсона);
PPI	– protein-protein interaction (міжбілкова взаємодія);
PRC2	– polycomb repressive complex 2 (репресивний комплекс полікомб 2);
RhoA	– Ras homolog family member A (член А родини Ras-гомологічних ГТФаз);
RMA	– robust multi-array average (метод нормалізації мікрочипових даних);

- ROCK – Rho-associated coiled-coil-containing kinase (Rho-асоційована кiназа з coiled-coil мотивом);
- RPMI-1640 – Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (культуральне середовище для клiтин кровi та кiсткового мозку);
- SAM – sterile alpha motif (стерильний альфа-мотив);
- SD – standard deviation (стандартне вiдхилення);
- SFK – Src family kinases (кiнази родини Src);
- SRC – proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (протоонкогенна тирозинпротеїнкiназа Src);
- STRING – search tool for the retrieval of interacting genes/proteins (платформа для аналізу мереж мiжбiлкових взаємодiй);
- SUZ12 – suppressor of zeste 12 (бiлок-супресор zeste 12);
- TAD – topologically associating domain (топологiчно асоційований домен);
- TSS – transcription start site (сайт початку транскрипцiї);
- UCSC – University of California, Santa Cruz (геномний браузер та база даних геному людини);
- USP7 – ubiquitin-specific protease 7 (убiквітин-специфiчна протеаза 7);
- WGBS – whole-genome bisulfite sequencing (повногеномне бiсульфiтне секвенування для визначення метилювання ДНК);
- XPO1 – exportin 1 (експортин 1).

ЗМІСТ

ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. Молекулярні механізми патогенезу BCR-ABL-позитивної хронічної мієлоїдної лейкемії	10
1.1. Химерний онкобілок BCR-ABL як ключовий драйвер патогенезу хронічної мієлоїдної лейкемії.....	10
1.2. Структурна організація та пухлинно-супресорні функції білка DLC1	13
1.2.1. Геномна локалізація гену <i>DLC1</i>	13
1.2.2. Мультидоменна архітектура білка DLC1	14
1.2.3. Механізми пухлинно-супресорної дії DLC1	16
1.3. Посттрансляційна регуляція DLC1: фосфорилування, деградація та нуклеоцитоплазматичний транспорт	17
1.3.1. Автоінгібіторна конформація та активація за участі CDK5	17
1.3.2. Інактивація за участі кіназ родини SRC та ERK.....	18
1.3.3. Протеасомна деградація: EZH2-опосередковані та HECTD1/USP7-залежні механізми	19
1.4. DLC1 у гематологічних злоякісних новоутвореннях: експериментальні дані та механістичні аспекти.....	20
1.4.1. Епігенетичне пригнічення експресії <i>DLC1</i> у гематологічних пухлинах.....	20
1.4.2. Перспектива дослідження ролі DLC1 у розвитку хронічної мієлоїдної лейкемії.....	21
1.4.3. RhoA-залежний сигналінг за хронічної мієлоїдної лейкемії як функціональна мішень DLC1.....	22
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	23
2.1. Дизайн експерименту та біологічний матеріал.....	23

	7
2.2. Культивування клітинної лінії K562	24
2.3. Обробка клітин інгібітором тирозинкінази	25
2.4. Антитіла та реагенти.....	26
2.5. Імунофлуоресцентний аналіз та приготування мікропрепаратів.....	27
2.6. Конфокальна лазерна скануюча мікроскопія.....	28
2.7. Кількісний аналіз колокалізації білків	30
2.8. Біоінформатичний аналіз.....	32
2.8.1. Транскриптомні дані та методи статистичного аналізу.....	32
2.8.2. Набори епігеномних даних та методи їх обробки	36
2.8.3. Методи мережевого аналізу міжбілкових взаємодій та сигнальних шляхів	41
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	46
3.1. Колокалізація DLC1 з онкобілком BCR-ABL у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії.....	46
3.2. Вплив інгібування тирозинкіназної активності BCR-ABL іматинібом на субклітинну локалізацію DLC1	49
3.3. Транскрипційна стабільність DLC1 у клінічних когортах хронічної мієлоїдної лейкемії.....	52
3.4. Характеристика епігенетичного ландшафту локусу <i>DLC1</i>	61
3.5. Мережевий аналіз сигнальних шляхів, асоційованих із BCR-ABL.....	71
3.6. Аналіз препарат-ген взаємодій у мережі регуляторів DLC1	74
ВИСНОВКИ	80
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	82

ВСТУП

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) є мієлопроліферативним захворюванням, молекулярний патогенез якого визначається химерним онкобілком BCR-ABL1 (від «breakpoint cluster region – Abelson murine leukemia viral oncogene»), химерний онкогенний білок, що формується внаслідок поєднання двох генів – BCR та ABL – в результаті генетичної помилки (транслокації) при ХМЛ). Конститутивна тирозинкіназна активність BCR-ABL активує каскади RAS/ERK, PI3K/AKT та JAK/STAT5, що забезпечують проліферацію і виживання лейкемічних клітин. Незважаючи на успіхи таргетної терапії інгібіторами тирозинкінази (ІТК), проблеми резистентності та прогресії до бластного кризу зберігають клінічну актуальність і вказують на необхідність поглибленого вивчення додаткових регуляторних компонентів патогенезу.

Ген *DLC1* (від «deleted in liver cancer 1», ген/білок, видалений при раку печінки 1) кодує мультидоменний білок DLC1, що функціонує як Rho ГТФаза-активуєчий протеїн (Rho GTPase-activating protein, RhoGAP) і пухлинний супресор через інактивацію RhoA/ROCK-сигналізації (RhoA – Ras homolog family member A, член А родини Ras-гомологічних ГТФаз; ROCK – Rho-associated coiled-coil-containing kinase, Rho-асоційована кінза з coiled-coil мотивом) та регуляцію цитоскелетної динаміки й клітинної міграції. Інактивація DLC1 через гіперметилування промотора широко задокументована при солідних пухлинах і окремих гематологічних злоякісних новоутвореннях. Проте роль DLC1 залишається практично не охарактеризованою: наявні дані суперечливі, а механізми регуляції білка в межах BCR-ABL-залежного сигналіngu не вивчені. Оскільки BCR-ABL конститутивно активує SRC-кінази, ERK та AKT, існує обґрунтована гіпотеза про посттрансляційну, а не транскрипційну природу інактивації DLC1 у клітинах ХМЛ.

Метою роботи стало проаналізувати молекулярні механізми регуляції пухлинного супресора *DLC1* за BCR-ABL-позитивної хронічної мієлоїдної лейкемії.

Для досягнення поставленої мети було поставлено такі завдання:

1. Дослідити субклітинну локалізацію *DLC1* та його просторову колоколізацію з BCR-ABL у клітинній лінії K562 методами конфокальної імуофлуоресцентної мікроскопії, а також оцінити розподіл *DLC1* за інгібування BCR-ABL іматинібом.

2. Кількісно проаналізувати рівень експресії *DLC1* у різних клінічних фазах хронічної мієлоїдної лейкемії та порівняти його з таким у нормальних гемопоетичних клітинах за допомогою публічних наборів мікрочипових даних (GEO: GSE4170, GSE13159).

3. Охарактеризувати епігеномний стан локусу *DLC1* у клітинах K562 та первинних CD34⁺ гемопоетичних клітинах шляхом аналізу даних ENCODE/Roadmap Epigenomics.

4. Побудувати мережу міжбілкових взаємодій *DLC1* у контексті BCR-ABL-сигналіngu, виявити ключові функціональні модулі та визначити потенційні терапевтичні мішені для відновлення активності пухлинного супресора.

РОЗДІЛ 1

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ПАТОГЕНЕЗУ BCR-ABL-ПОЗИТИВНОЇ ХРОНІЧНОЇ МІЄЛОЇДНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ

1.1. Химерний онкобілок BCR-ABL як ключовий драйвер патогенезу хронічної мієлоїдної лейкемії

Хронічна мієлоїдна лейкемія є клональним мієлопроліферативним захворюванням гемопоетичних стовбурових клітин, молекулярна основа якого була остаточно встановлена після ідентифікації філадельфійської хромосоми (Ph-хромосоми) – аномально вкороченої 22-ї хромосоми людини, утвореної внаслідок реципрокної транслокації генетичного матеріалу між довгими плечами хромосом 9 і 22, $t(9;22)(q34;q11)$. На рис. 1.1 зображено механізм цієї хромосомної перебудови, в результаті якої ген *BCR* на хромосомі 22 зливається з геном *ABL1*, що кодує нерцепторну тирозинкіназу c-ABL, розташованим на хромосомі 9, що призводить до утворення химерного гена *BCR-ABL1*.

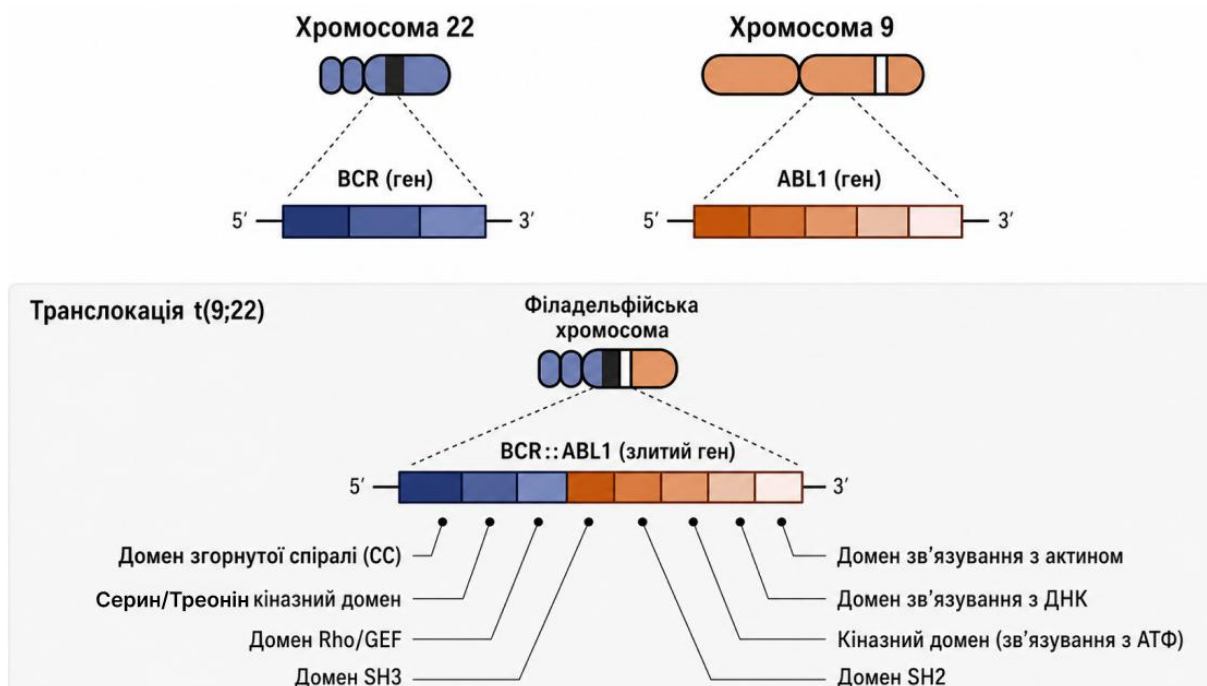


Рис. 1.1. Формування химерного білка BCR-ABL1 (Jiang, 2026)

Відповідний онкогенний білок BCR-ABL характеризується конститутивною та deregulованою тирозинкіназною активністю, яка є необхідною і достатньою для лейкемічної трансформації гемопоетичних клітин-попередників.

Три основні ізоформи BCR-ABL виникають внаслідок різних точок розриву в гені BCR: p190 (злиття e1a2), що переважно асоційована з Ph-позитивною гострою лімфобластною лейкемією (ГЛЛ) та меншою часткою випадків ХМЛ; p210 (злиття b2a2 або b3a2), яка є типовою для класичної ХМЛ і становить близько 95% випадків; та p230 (злиття e19a2), пов'язана з рідкісним варіантом хронічної нейтрофільної лейкемії (Miki, 2018). Ізоформа p210 має особливе значення, оскільки містить N-кінцевий домен BCR, відповідальний за олігомеризацію, домен гомології Dbl (Dbl-homology domain, DH-домен), а також сайт зв'язування адаптерного білка Grb2 (тирозин Y177), що значно розширює спектр онкогенної сигналізації порівняно з p190 (Reckel, 2017). Важливо, що DH-домен надає білку активність фактора обміну гуанінових нуклеотидів (guanine nucleotide exchange factor, GEF-активність) щодо RhoA та споріднених ГТФаз, формуючи прямий механістичний зв'язок між BCR-ABL і активацією Rho-сигналізації.

Конститутивна тирозинкіназна активність BCR-ABL реалізується через складну та функціонально надлишкову мережу сигнальних каскадів. Зокрема, шлях кінази, що регулюється позаклітинними сигналами (extracellular signal-regulated kinase, ERK), або RAS/RAF/MEK/ERK шлях, активується через фосфорилування адаптерного білка Grb2 у положенні Y177, що забезпечує рекрутинг комплексу Grb2-SOS та подальшу активацію RAS, стимулюючи транскрипційні програми проліферації та входження клітин у клітинний цикл (Sattler, 2003). Паралельно активується шлях PI3K/АКТ/mTOR, який забезпечує виживання клітин і резистентність до апоптозу шляхом АКТ-залежної інактивації проапоптотичних білків (BAD, FOXO3a, GSK3β) та активації NF-κB. Вісь JAK2/STAT5 є третьою ключовою

гілкою сигналізації, де активація STAT5 є критичною для проліферативної автономії клітин і підвищеної експресії антиапоптотичних генів, таких як *BCL-XL* та *MCL-1*. Особливе значення для регуляції DLC1 має конститутивна активація кіназ родини SRC (Src family kinases, SFK), зокрема HCK, LYN, FGR і FYN, які безпосередньо активуються BCR-ABL і виступають ключовими посередниками передачі сигналу до численних субстратів, включаючи білки, що регулюють цитоскелет і клітинну адгезію (Hu, 2004).

Клінічний перебіг BCR-ABL-позитивної ХМЛ включає три фази прогресуючої агресивності: хронічну фазу (chronic myeloid leukemia, chronic phase – CML-CP), що характеризується клональною експансією мієлоїдних клітин зі збереженою диференціацією та чутливістю до терапії ІТК; акселеровану фазу (chronic myeloid leukemia, accelerated phase – CML-AP), що супроводжується накопиченням додаткових генетичних і молекулярних змін та зниженням терапевтичної відповіді; та бластний криз (chronic myeloid leukemia, blast crisis – CML-BC), який відповідає трансформації у гостру лейкемію з накопиченням вторинних мутацій, епігенетичною перебудовою та резистентністю до монотерапії (Chereda, 2015). Втрата функції пухлинних супресорів, зокрема через епігенетичне пригнічення, посттрансляційну інактивацію або деградацію білків, відіграє ключову роль у цій прогресії.

Впровадження іматинібу (STI571), першого селективного ІТК для BCR-ABL1, стало проривом у лікуванні ХМЛ і сформувало концепцію таргетної терапії в онкології (Druker, 2001; Druker, 2006). Подальша розробка ІТК другого покоління – дазатинібу, нілотинібу, бозутинібу – та третього покоління (понатинібу), ефективного щодо мутації T315I, значно розширила терапевтичні можливості (Jabbour, 2018; Jabbour, 2022; Jabbour, 2024). Проте серйозною проблемою залишається виживання лейкемічних стовбурових клітин у кістковомозковому мікрооточенні, що зумовлено кіназонезалежними механізмами, включаючи сигнали клітинної адгезії, зміни цитоскелету та епігенетичну регуляцію – процеси, у яких безпосередню роль відіграє DLC1.

1.2. Структурна організація та пухлинно-супресорні функції білка DLC1

DLC1 є мультидоменним білком, що слугує RhoGAP. Структурна організація цього білка визначає його здатність інтегрувати сигнали клітинної адгезії, цитоскелетної динаміки та внутрішньоклітинної сигналізації. Пухлинно-супресорні функції DLC1 реалізуються як через RhoGAP-залежні механізми, що забезпечують інактивацію RhoA-сигналізації, так і через RhoGAP-незалежні білок-білкові взаємодії. Порушення структури, регуляції або локалізації DLC1 призводить до втрати його супресорної активності й сприяє прогресії злоякісного фенотипу клітин.

1.2.1. Геномна локалізація гену *DLC1*

Ген *DLC1* (*Deleted in Liver Cancer 1*; також відомий як *STARD12* і *ARHGAP7*) локалізований у хромосомному регіоні 8p22–p21.3 та кодує повсюдно експресований білок з RhoGAP-активністю, поліпептидний ланцюг якого налічує 1091 амінокислоту (канонічна ізоформа 2; UniProt Q96QB1). Ген було вперше ідентифіковано шляхом диференційного скринінгу пухлин гепатоцелюлярної карциноми і клітинних ліній раку печінки як локус, що зазнає частих гомозиготних делецій. Подальші дослідження показали, що втрата *DLC1* є однією з найпоширеніших геномних подій у раку людини, перевищуючи за частотою втрату таких класичних пухлинних супресорів, як *TP53*, *PTEN* і *CDKN2A*, у низці основних типів пухлин, включаючи гепатоцелюлярний рак, рак легені, молочної залози, товстої кишки та яєчників (Хуе, 2008).

DLC1 є членом родини з трьох паралогічних білків DLC у ссавців – DLC1, DLC2 (*STARD13*) і DLC3 (*STARD8*), які мають консервативну доменну архітектуру, але відрізняються тканинною специфічністю,

субстратною селективністю та механізмами регуляції (Chau, 2022). Гени, що кодують усі три білки DLC, представлені в геномах багатоклітинних організмів і мають єдиний ортолог у *Drosophila melanogaster* та *Caenorhabditis elegans*, що підкреслює їхню фундаментальну роль у клітинній біології метазоїв.

1.2.2. Мультидоменна архітектура білка DLC1

DLC1 є мультидоменним білком-скафолдом, пухлинно-супресорна активність якого зумовлена скоординованою дією щонайменше чотирьох структурно відмінних модулів (Liu, 2021). Розуміння цієї архітектури є необхідною передумовою для інтерпретації регуляції DLC1, зокрема в контексті BCR-ABL-залежної сигналізації (Chau, 2022; Yang, 2011). N-кінцевий домен стерильного альфа-мотиву (sterile alpha motif, SAM-домен; приблизно залишки 17–76) є модулем білок-білкових взаємодій, який забезпечує зв'язування з фактором елонгації 1A1 (elongation factor 1A1, EF1A1).

Показано, що взаємодія SAM–EF1A1 сприяє переміщенню EF1A1 до периферії мембрани та ламеліподій і пригнічує клітинну міграцію незалежно від RhoGAP-активності (Zhong., 2009). Відсутність SAM-домену в ізоформі DLC1v4 (яка починається з залишку 512) визначає зміну спектра пухлинно-супресорних функцій у клітинах, де ця ізоформа переважно представлена, зокрема при раку шлунка (Hinsenkamp, 2022).

Розширений збагачений серином лінкерний регіон між SAM- і RhoGAP-доменами (приблизно залишки 77–1072) є основним регуляторним центром молекули DLC1. Він містить ділянку таргетування до фокальних адгезій (focal adhesion targeting region, FAT-регіон; приблизно залишки 265–459), яка забезпечує локалізацію DLC1 у фокальних адгезіях шляхом взаємодії з SH2-доменами білків родини тенсинів (TNS1–TNS4) та доменом R8 адапторного

білка таліну (TLN1/TLN2). Через ці взаємодії DLC1 позиціонується в ділянках активної інтегринової сигналізації, де концентрація мембранозв'язаної ГТФази RhoA є максимальною. Лінкерний регіон також містить численні сайти для фосфорилування циклін-залежною кіназою 5 (cyclin-dependent kinase 5, CDK5; S120, S205, S422, S509 – призводить до активації через відкриту конформацію), кіназою SRC (sarcoma kinase; Y451, Y701 – веде до інактивації), ERK (S129 – сприяє SRC-залежній інактивації) та протеїнкіназою В (також відомою як АКТ; S329 – знижує RhoGAP-активність).

Центральний RhoGAP-домен (приблизно залишки 1072–1290) є каталітичним ядром DLC1, консервативним для суперродини RhoGAP-білків, що характеризуються наявністю каталітичного «аргінінового пальця». Залишок аргініну (R1114) стабілізує перехідний стан гідролізу ГТФ у ГТФазах RhoA, Cdc42 і Rac1, переводячи їх у неактивну ГДФ-зв'язану форму та пригнічуючи Rho-залежну сигналізацію (Wong, 2003; Chau, 2022). Основними субстратами DLC1 є RhoA, RhoB і RhoC, хоча також описана нижча активність щодо Cdc42, Rac1 і TC10 (Healy, 2008). Мутації, що порушують функцію «аргінінового пальця» (R718E/R1114E), повністю елімінують RhoGAP-активність, не впливаючи на інші білок-білкові взаємодії, що дозволяє розмежовувати GAP-залежні та незалежні механізми функції DLC1.

С-кінцевий START-домен (від англ. *StAR-related lipid transfer domain*; приблизно залишки 1290–1528) забезпечує зв'язування з ліпідами, таргетування до плазматичної мембрани та взаємодію з кавеоліном-1 і фосфоліпазою Сδ1. Показано, що пухлинно-супресорна функція DLC1 залежить від взаємодії START-домену з фосфатидилсерином, фосфоліпазою Сδ1 і кавеоліном-1, що підкреслює його роль у просторовій регуляції RhoGAP-активності в специфічних мембранних мікродоменах (Ng, 2021).

1.2.3. Механізми пухлинно-супресорної дії DLC1

Пухлинно-супресорна функція DLC1 реалізується через поєднання RhoGAP-залежних і незалежних механізмів (Kreider-Letterman, 2022). На експериментальних моделях показано, що відновлення експресії DLC1 у пухлинних клітинах пригнічує проліферацію, міграцію, інвазію та ріст колоній у напівтвердому середовищі у широкому спектрі пухлин (Yuan, 2003; Ullmannova-Benson, 2009; Yang, 2011). Водночас каталітично неактивний мутант DLC1 (R718E) зберігає здатність пригнічувати міграцію та інвазію, але не проліферацію, що свідчить про існування RhoGAP-незалежних механізмів супресорної дії (Healy, 2008; Yang, 2011). RhoGAP-залежний механізм полягає в інактивації RhoA, RhoB і RhoC, що призводить до зниження RhoA/ROCK-залежної актоміозинової контрактильності, дестабілізації стресових актинових філаментів і фокальних адгезій, а також пригнічення транскрипційних ефекторів SRF і YAP/TAZ.

Функціональні наслідки включають зниження міграційної здатності клітин, уповільнення клітинного циклу через дестабілізацію цикліну D1 та індукцію аноїкісу внаслідок порушення інтегрин-залежної виживаної сигналізації. RhoGAP-незалежні механізми опосередковуються білок-білковими взаємодіями SAM- та лінкерного доменів. Зокрема, DLC1 взаємодіє з білком S100A10, витісняючи його з комплексу із анексином A2 (комплекс S100A10–анексин A2 є головним рецептором для плазміногену на поверхні клітин), що призводить до убіквітин-залежної деградації S100A10 і зниження активації плазміногену – ключового процесу ремоделювання позаклітинного матриксу та інвазії (Yang, 2011). Подібним чином, взаємодія SAM-домену з EF1A1 пригнічує залежну від ламеліподій міграцію незалежно від RhoGAP-активності (Zhong, 2009). Останні дослідження продемонстрували, що функція DLC1 може набувати контекстзалежного характеру: у меланомі ядерна локалізація DLC1 асоціюється з онкогенною активністю через транскрипційну коактивацію *MMP9* у комплексі з FOXK1

(Yang, 2020). Це підкреслює вирішальне значення субклітинної локалізації DLC1 і безпосередньо стосується аналізу його ролі в BCR-ABL-позитивних клітинах, де виявлено ядерне накопичення цього білка.

1.3. Посттрансляційна регуляція DLC1: фосфорилування, деградація та нуклеоцитоплазматичний транспорт

Посттрансляційна регуляція DLC1 відіграє ключову роль у контролі його функціональної активності, визначаючи баланс між активною та неактивною конформаціями білка. Фосфорилування різними кіназами, зокрема CDK5, SRC, ERK та АКТ, може як активувати, так і пригнічувати RhoGAP-активність DLC1, а також впливати на його субклітинну локалізацію. Стабільність DLC1 додатково регулюється через убіквітинзалежну протеасомну деградацію та механізми нуклеоцитоплазматичного транспорту, що в сукупності визначає його пухлинно-супресорну функцію.

1.3.1. Автоінгібіторна конформація та активація за участі CDK5

Білок DLC1 перебуває в рівновазі між функціонально неактивною «закритою» конформацією, що підтримується внутрішньомолекулярними взаємодіями між N-кінцевим SAM-доменом і RhoGAP-доменом, та активною «відкритою» конформацією, яка забезпечує повну RhoGAP-активність і локалізацію у фокальних адгезіях. У закритому стані ці взаємодії одночасно пригнічують каталіз і перешкоджають зв'язуванню з білками родини тенсинів.

Показано, що кіназа CDK5 фосфорилує DLC1 за чотирма залишками серину лінкерного регіону (S120, S205, S422, S509), порушуючи

автоінгібіторну взаємодію та переводячи білок у функціонально активний стан (Tripathi, 2014). Таким чином, активність DLC1 визначається не лише рівнем його експресії, а й балансом посттрансляційних модифікацій – міркування, особливо важливе в умовах BCR-ABL-залежної сигналізації, де активність кіназного ансамблю суттєво змінена.

1.3.2. Інактивація за участі кіназ родини SRC та ERK

Одним із ключових механізмів регуляції DLC1 за BCR-ABL-позитивної ХМЛ є його інактивація шляхом фосфорилування кіназами родини SRC та ERK. Показано, що SRC фосфорилує DLC1 за двома тирозиновими залишками з різними функціональними наслідками: фосфорилування Y451 у FAT-регіоні порушує взаємодію з SH2-доменами тенсинів, що призводить до від'єднання DLC1 від фокальних адгезій і втрати просторового контакту з мембранозв'язаною RhoA; фосфорилування Y701 у межах RhoGAP-домену безпосередньо знижує його каталітичну активність (Tripathi, 2019).

Паралельно ERK1/2 фосфорилує DLC1 за S129, підвищуючи його спорідненість до SRC і формуючи підсилювальний каскад ERK → SRC → DLC1. У сукупності ці модифікації призводять до комплексної функціональної інактивації DLC1 без зміни рівня експресії білка. Цей механізм набуває особливого значення при ХМЛ, оскільки BCR-ABL конститутивно активує як кінази SFK (HCK, LYN, FGR, FYN), так і сигнальний шлях RAS/RAF/MEK/ERK. Зокрема, SFK активуються BCR-ABL і підтримують його трансформуючу активність через позитивний зворотний зв'язок (Hu, 2004). Додатково АКТ, як центральний ефектор PI3K-залежної сигналізації, фосфорилує DLC1 за S329, що ще більше знижує його RhoGAP-активність (Tripathi, 2017). Таким чином, у клітинах ХМЛ здійснюється багаторівнева кіназозалежна інактивація DLC1, де BCR-ABL безпосередньо

активує три незалежних ферментних системи – SFK, ERK і AKT, – що конвергентно пригнічують функцію DLC1.

1.3.3. Протеасомна деградація: EZH2-опосередковані та NECTD1/USP7-залежні механізми

Функціональна інактивація і стабільність білка DLC1 контролюється через убіквітин-залежну протеасомну деградацію. Показано, що цитоплазматичний EZH2 (від англ. enhancer of zeste homolog 2, підсилювач гомолога zeste 2), незалежно від своєї канонічної функції у ядрі, метилює DLC1 за залишком K678, що ініціює його убіквітинування та подальшу протеасомну деградацію (Tripathi, 2021). Фармакологічне інгібування EZH2 значно підвищує стабільність DLC1, що вказує на терапевтичний потенціал цього підходу для відновлення функції білка. Регуляція ядерного розподілу EZH2 пов'язана з активністю RAS, який через перинуклеарний комплекс із RanGAP1 сприяє експорту-1 (XPO1)/CRM1-залежному ядерному експорту EZH2 (Tripathi, 2024). Оскільки BCR-ABL активує RAS-сигналізацію через вісь Grb2/SOS, можна припустити, що каскад BCR-ABL → RAS → EZH2 → DLC1 відіграє роль у регуляції деградації DLC1 у клітинах ХМЛ, хоча це потребує прямого експериментального підтвердження. Описано також альтернативний механізм протеасомної регуляції за участі E3-убіквітинлігази NECTD1 (NECT domain E3 ubiquitin protein ligase 1, E3-убіквітинлігаза з NECT-доменом 1) та деубіквітинуючого ферменту USP7 (ubiquitin-specific protease 7, убіквітин-специфічна протеаза 7): NECTD1 стимулює деградацію DLC1, тоді як USP7 (убіквітин-специфічна протеаза 7) стабілізує білок шляхом деубіквітинування. Водночас USP7 стабілізує і BCR-ABL у клітинах ХМЛ, що створює терапевтичний парадокс: інгібування USP7 одночасно дестабілізує і онкогенний BCR-ABL, і пухлинно-супресорний DLC1 (Frey, 2022; Shan, 2021).

1.4. DLC1 у гематологічних злоякісних новоутвореннях: експериментальні дані та механістичні аспекти

Накопичені експериментальні та клінічні дані свідчать про важливу роль DLC1 у регуляції ключових процесів, що визначають злоякісний фенотип гематологічних пухлин. Порушення експресії або функціональної активності DLC1 асоціюється зі змінами цитоскелетної динаміки, клітинної міграції та виживання пухлинних клітин.

1.4.1. Епігенетичне пригнічення експресії DLC1 у гематологічних пухлинах

Найбільш поширеним механізмом інактивації DLC1 у гематологічних злоякісних новоутвореннях є гіперметилування CpG-острівців промоторної ділянки гена, що призводить до транскрипційного замовчування (сайленсингу). Незалежні дослідження задокументували цей механізм із різною частотою: при ГЛЛ у більш ніж у 80% педіатричних випадків (Taylor, 2007); при неходжкінських лімфомах у 60–90% різних В-клітинних підтипів (Shi, 2007; Ying, 2007); при множинній мієломі у 98% клітинних ліній і 78% первинних зразків пацієнтів (Ullmannova-Benson, 2009); при хронічній лімфоцитарній лейкемії приблизно у 89,7% випадків. Функціональне значення втрати експресії DLC1 було безпосередньо продемонстровано в моделі множинної мієломи: аденовірусна реекспресія DLC1 у клітинних лініях і первинних клітинах пацієнтів призводила до значного пригнічення інвазії та міграції, зниження рівня RhoA-ГТФ (активної форми RhoA), перебудови актинового цитоскелета та інгібування росту колоній в агарозному середовищі (Ullmannova-Benson, 2009). Це дослідження стало першим прямим підтвердженням пухлинно-супресорної ролі DLC1 у гематологічних новоутвореннях. За гострої мієлоїдної лейкемії клінічна

значущість DLC1 підтверджується прогностичними даними: низький рівень його експресії на момент встановлення діагнозу асоційований із гіршою загальною виживаністю пацієнтів (Li, 2022). Зниження рівня метилювання промотора DLC1 після терапії азацитидином (деметилюючий агент) корелює з кращою відповіддю на лікування (Martín, 2020), що демонструє можливість фармакологічної реактивації DLC1.

1.4.2. Перспектива дослідження ролі DLC1 у розвитку хронічної мієлоїдної лейкемії

На відміну від інших гематологічних пухлин, прямі дослідження ролі DLC1 у розвитку BCR-ABL-позитивної ХМЛ залишаються вкрай обмеженими. Виявлено метилювання промотора DLC1 у зразках кісткового мозку пацієнтів із лейкеміями, включаючи ХМЛ, проте без окремого аналізу частоти для цього захворювання (Uhm, 2009). В іншому дослідженні встановлено, що рівень експресії DLC1 у CD34+-клітинах при педіатричній ХМЛ може бути підвищеним порівняно з нормою – результат, що суперечить типовій моделі втрати функції пухлинного супресора (Youn, 2021).

Причини цього явища залишаються незрозумілими та можуть включати компенсаторні механізми, вікові особливості чи зміни ізоформного складу. На сьогодні відсутні систематичні дослідження, присвячені аналізу рівня білка DLC1, його фосфорилювання, субклітинної локалізації та функціональної активності в клітинних моделях ХМЛ або зразках пацієнтів на різних стадіях захворювання. З огляду на відомі механізми багаторівневої інактивації DLC1, можна припустити, що його функціональна втрата є важливим, але недостатньо дослідженим компонентом патогенезу ХМЛ.

1.4.3. RhoA-залежний сигналінг за хронічної мієлоїдної лейкемії як функціональна мішень DLC1

Якщо інактивація DLC1 сприяє патогенезу ХМЛ, її функціональні наслідки реалізуються насамперед через дерегуляцію основного субстрату – ГТФази RhoA. Накопичені дані свідчать, що RhoA є функціональним драйвером лейкемогенезу при ХМЛ. Показано, що RhoA відіграє центральну регуляторну роль у поліморфноядерних лейкоцитах при ХМЛ, витісняючи Ras як ключову ГТФазу, що контролює проліферацію клітин; фармакологічне інгібування ефектора RhoA – ROCK – за допомогою Y-27632 або фасудилу пригнічує проліферацію клітин ХМЛ, причому більш виражено у клітинах із мутацією T315I, резистентних до іматинібу (Molli, 2012; Sun, 2024).

Нокаут гена *RHOA* у BCR-ABL-позитивних клітинних лініях (K562, KU812) призводив до пригнічення лейкемогенезу в ксенотрансплантаційних моделях, зниження адгезії клітин до фібронектину та порушення їх гомінгу до кісткового мозку (Zhang, 2023). Ідентифіковано транскрипційний каскад $RHOA \rightarrow SRF \rightarrow IGFBP2$, через який RhoA сприяє інвазії та прогресії ХМЛ; підвищену експресію IGFBP2 підтверджено у первинних зразках пацієнтів (Zhang, 2023). Крім того, інгібування ROCK синергічно посилює ефект іматинібу щодо CD34⁺-клітин-попередників ХМЛ у культурі (Burthem, 2007). Оскільки DLC1 є ключовим RhoA-GAP, його інактивація – незалежно від механізму – може призводити до додаткового підвищення рівня RhoA-ГТФ понад той, що забезпечується власною GEF-активністю BCR-ABL. Таким чином, можлива функціональна кооперація між BCR-ABL-індукованою активацією RhoA та втратою супресорної дії DLC1, що разом підтримують патологічно підвищену Rho-сигналізацію, необхідну для ефективного лейкемогенезу.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Дизайн експерименту та біологічний матеріал

У межах даної роботи матеріали дослідження сформовано з урахуванням як експериментальної моделі хронічної мієлоїдної лейкемії, так і відкритих високопродуктивних транскриптомних даних, що дозволило комплексно охарактеризувати роль гена *DLC1* у *BCR-ABL*-позитивному контексті. Експериментальна частина базувалася на аналізі клітинної лінії з використанням методів імуофлуоресценції для оцінки субклітинної локалізації та взаємодій білкових структур. Біоінформатичний етап включав отримання, попередню обробку та статистичний аналіз даних експресії генів із застосуванням сучасних обчислювальних інструментів і мов програмування. Використані підходи дозволили дослідити зміни експресії *DLC1* у різних фазах захворювання, а також виявити потенційні регуляторні механізми, пов'язані з сигнальними шляхами *BCR-ABL*. Інтеграція експериментальних результатів із даними *in silico* аналізу забезпечила більш глибоке розуміння молекулярних процесів та підвищила надійність отриманих висновків.

Об'єктом дослідження слугувала клітинна лінія K562 – стандартна експериментальна модель *BCR-ABL*-позитивної хронічної мієлоїдної лейкемії. Клітинна лінія K562 була надана Інститутом експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України. Клітини K562, виділені від пацієнта з ХМЛ під час стадії *CML-BC*, характеризуються наявністю *Ph*-хромосоми (Ph^+) і додаткової хромосомної перебудови *t(15;17)*. Ці клітини конститутивно експресують онкогенний химерний білок *BCR-ABL* ізоформи p210 (злиття *b3a2*), що зумовлює їхню

нерегульовану проліферацію та слугує центральним молекулярним драйвером лейкемічної трансформації.

Лінія K562 є зручною та широко визнаною моделлю для вивчення молекулярних механізмів патогенезу ХМЛ завдяки стабільній експресії онкобілка BCR-ABL, чутливості до ІТК, зокрема іматинібу, та добре охарактеризованому транскриптому і протеому. Важливо, що клітини K562 позбавлені функціонального p53 і мають мінімальну базальну експресію ряду пухлинних супресорів, що дозволяє аналізувати вплив BCR-ABL-залежної сигналізації на регуляцію DLC1 у відносно «чистому» онкогенному контексті.

2.2. Культивування клітинної лінії K562

Культивування клітин K562 здійснювали в поживному середовищі RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium 1640 – культуральне середовище для клітин крові та кісткового мозку, Sigma-Aldrich, США) з додаванням 10% (об./об.) ембріональної сироватки великої рогатої худоби (EC VPX; Sigma-Aldrich, США), пеніциліну (50 Од/мл) та стрептоміцину (100 мкг/мл). Клітини культивували у зволоженій атмосфері при температурі +37°C і концентрації CO₂ 5%. При досягненні 70–80% конфлюентності клітини пересівали у розведенні 1:10. Для стандартизації досліджень використовували клітини не вище 30 пасажу (Antonenko, 2020).

Перед кожним експериментом оцінювали життєздатність клітин із застосуванням барвника трипановий синій: до 10 мкл суспензії клітин додавали рівний об'єм 0,4% розчину трипанового синього (Sigma-Aldrich, США), інкубували 2 хв. та підраховували живі (незабарвлені) і мертві (забарвлені) клітини в камері Горяєва під світловим мікроскопом. Для подальшої роботи використовували лише культури з життєздатністю $\geq 90\%$.

2.3. Обробка клітин інгібітором тирозинкінази

Для дослідження ролі тирозинкіназної активності BCR-ABL у регуляції субклітинної локалізації DLC1 клітини K562 обробляли іматинібом мезилатом (Novartis/Sigma-Aldrich, США), який є високоселективним ІТК для BCR-ABL1, що конкурентно зв'язує АТФ-зв'язувальну кишеню кінази в неактивній конформації (Druker, 2001). Іматиніб зберігали у вигляді вихідного розчину з концентрацією 10 мМ у диметилсульфоксиді (ДМСО; Sigma-Aldrich, США) при -20°C . Для приготування робочого розчину вихідний розчин розводили свіжим середовищем RPMI-1640 безпосередньо перед використанням. Кінцева концентрація ДМСО у культуральному середовищі не перевищувала 0,025%, що не чинить статистично значущого впливу на клітинну морфологію або виживаність за даних умов. Схема обробки клітин: клітини K562 висівали у концентрації 5×10^5 клітин/мл і обробляли іматинібом у кінцевій концентрації 2,5 мМ. Вибір концентрації обґрунтований тим, що вона є достатньою для повного інгібування автофосфорильовання BCR-ABL за Y393 у клітинах K562 (що підтверджено попередніми дослідженнями С. Антоненко (Antonenko, 2020)) та перебуває у межах терапевтично релевантного діапазону концентрацій іматинібу в плазмі крові пацієнтів із ХМЛ (Jabbour, 2018). Контрольні зразки були звичайно культивовані відповідно до методики. Інкубацію проводили протягом 24 год. у стандартних умовах культивування ($+37^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 95% відносна вологість). Тривалість обробки 24 год. була обрана на підставі того, що вона достатня для спостереження змін субклітинного розподілу білків, зумовлених пригніченням тирозинкіназної активності, та не викликає масової загибелі клітин при застосованій концентрації іматинібу.

2.4. Антитіла та реагенти

Для детекції DLC1 як первинні антитіла використовували кролячі поліклональні антитіла анти-DLC1 (H-260; Santa Cruz Biotechnology, США), що специфічно розпізнають амінокислотні залишки 502–761 DLC1 людини і придатні для застосування у конфокальній імуофлуоресцентній мікроскопії. Антитіла розводили у співвідношенні 1:100 у блокувальному буфері (1% бичачий сироватковий альбумін (bovine serum albumin, BSA) у фосфатно-сольовому буфері (phosphate-buffered saline, PBS)). PBS готували як 10× концентрований розчин: 140 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,8 мМ KH₂PO₄, рН 7,4. Для роботи розбавляли до 1× концентрації дистильованою водою. Для детекції онкобілка BCR-ABL використовували мишачі моноклональні антитіла, спрямовані проти ABL1-кіназного домену (первинні антитіла анти-BCR-ABL (анти-ABL1); Santa Cruz Biotechnology, США; розведення 1:100 у 1% BSA/PBS).

Для виявлення кролячих первинних антитіл (анти-DLC1) застосовували козячі антитіла проти IgG кролика, кон'юговані з флуорофором Alexa Fluor 488 (Molecular Probes/Thermo Fisher Scientific, США; довжина хвилі збудження 488 нм, максимум емісії 519 нм), розведення 1:250 у 1% BSA/PBS. Для виявлення мишачих антитіл (анти-BCR-ABL) застосовували козячі антитіла проти IgG миші, кон'юговані з Alexa Fluor 568 (Molecular Probes/Thermo Fisher Scientific, США; збудження 568 нм, емісія 603 нм), розведення 1:250. Вторинні антитіла інкубували у захищеному від світла середовищі для запобігання фотовибілюванню флуорофорів.

Для ядерного контрастування використовували флуоресцентний ДНК-зв'язувальний барвник 4',6-діамідино-2-феніліндол (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI; Thermo Fisher Scientific, США) в розведенні 1:2500 у PBS. Для фіксації клітин застосовували 4% розчин параформальдегіду (ПФА; Sigma-Aldrich, США) у PBS. Для проникнення антитіл крізь плазматичну мембрану використовували детергент Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США;

0,2% (об./об.) у фіксувальному розчині). Для блокування неспецифічного зв'язування антитіл – 1% розчин BSA у PBS. Мікропрепарати монтували із використанням гелеподібного середовища CitiFluor™ AF1 (Science Services, Німеччина), яке запобігає швидкому фотовибліюванню та забезпечує довготривале збереження флуоресцентного сигналу.

2.5. Імунофлуоресцентний аналіз та приготування мікропрепаратів

Приготування імунофлуоресцентних мікропрепаратів проводили за модифікованим протоколом С. Антоненко (Antonenko, 2020), адаптованим для суспензійних клітинних ліній. Усі процедури, що не вимагали специфічних температурних умов, виконували при кімнатній температурі. Клітини K562 центрифугували при 2000 об./хв. протягом 1,5–2 хв. Супернатант обережно декантували, осад ресуспендували і двічі промивали фосфатно-сольовим буфером PBS для видалення залишків поживного середовища.

Відмиті клітини ресуспендували у невеликому об'ємі PBS і наносили на попередньо знежирені предметні скельця. Для кращої адгезії суспензійних клітин скельця обробляли полі-L-лізином (0,1 мг/мл, 10 хв., кімнатна температура) або виконували цитоспін-препарати (цитоцентрифугування при 600 об./хв., 5 хв.). Клітини фіксували у 4% розчині ПФА, що містив 0,2% Triton X-100 у PBS, упродовж 15 хв. при кімнатній температурі. Поєднана фіксація з одночасною пермеабілізацією спрощує протокол і забезпечує рівномірний доступ антитіл до внутрішньоклітинних антигенів (Yang, 2011). Після фіксації скельця тричі промивали PBS (загальна тривалість відмивань – 1 год) для повного видалення залишків ПФА.

Для мінімізації неспецифічного зв'язування первинних і вторинних антитіл скельця інкубували у блокувальному розчині (1% BSA у PBS) протягом 30–60 хв. при кімнатній температурі у вологій камері. BSA

ефективно насичує неспецифічні сайти зв'язування білків на поверхні клітин. Блокувальний розчин обережно видаляли (без промивання), і скельця одночасно інкубували з двома первинними антитілами: анти-DLC1 (1:100 у 1% BSA/PBS) та анти-BCR-ABL (1:100 у 1% BSA/PBS) протягом 1 год. при кімнатній температурі у вологій камері. Такий підхід дозволяє одночасно виявляти обидва білки в рамках одного мікропрепарату. У препаратах ізотипового контролю первинні антитіла замінювали нормальною сироваткою відповідного виду тварин у тій самій кінцевій концентрації. Після інкубації скельця тричі ретельно промивали PBS (по 5 хв. кожне промивання). Скельця інкубували з сумішшю вторинних антитіл: Alexa Fluor 488 («анти-кролик», 1:250 у 1% BSA/PBS) для детекції DLC1 (зелений канал) та Alexa Fluor 568 («анти-миша», 1:250 у 1% BSA/PBS) для детекції BCR-ABL (червоний канал) протягом 1 год. при кімнатній температурі у повній темряві. Після завершення інкубації скельця тричі промивали PBS.

Ядра клітин фарбували DAPI (1:2500 у PBS) протягом 2 хв. при кімнатній температурі у темряві, після чого скельця тричі промивали PBS. Мікропрепарати монтували на предметних скельцях з використанням монтажного середовища CitiFluor™ AF1. Після монтажу краї покривного скельця запечатували безбарвним лаком для нігтів. Готові препарати зберігали в темряві при +4°C до проведення мікроскопічного аналізу.

2.6. Конфокальна лазерна скануюча мікроскопія

Аналіз флуоресцентних мікропрепаратів проводили на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Німеччина) за методикою (Elliott, 2020). Конфокальна мікроскопія забезпечує оптичне «секціонування» зразка – реєстрацію флуоресцентного сигналу виключно з тонкого фокального шару (0,5–1,0 мкм) без засвічення від нефокальних рівнів, що є критичним для точного визначення субклітинної

локалізації білків. Використовували планпохроматичний масляний імерсійний об'єктив (100×, числова апертура $NA = 1,25$), що забезпечує просторову роздільну здатність $\sim 220\text{--}250$ нм у латеральній площині (осі x/y) та ~ 600 нм по осі z – достатню для достовірного розмежування ядерного та цитоплазматичного компартментів клітин K562 (діаметр ядра $\sim 10\text{--}12$ мкм). Для уникнення спектрального перекривання між каналами зображення реєстрували методом послідовного збудження: кожен флуорофор збуджували окремо, у такому порядку:

1) Синій канал (DAPI): збудження діодним лазером 405 нм; емісію реєстрували у діапазоні 415–480 нм.

2) Зелений канал (Alexa Fluor 488 / DLC1): збудження аргонним лазером 488 нм; емісія 505–560 нм.

3) Червоний канал (Alexa Fluor 568 / BCR-ABL): збудження гелій-неоновим лазером 543 нм; емісія 565–615 нм.

Ізольована реєстрація каналів унеможлиблює вплив одного флуорофора на інший і забезпечує коректну інтерпретацію результатів колокалізації. Для встановлення точної субклітинної локалізації DLC1 і BCR-ABL збирали оптичні серії z -зрізів (z -стеки) з кроком 0,5 мкм упродовж повної товщини клітин. На основі z -стеків отримували проєкції максимальної інтенсивності, що відображають найбільш яскравий піксель уздовж осі z і відтворюють тривимірний розподіл білків у двовимірному зображенні. Збір серій z -зрізів є стандартним підходом при кількісному аналізі субклітинного розподілу білків у конфокальній мікроскопії.

Параметри мікроскопії (потужність лазера, підсилення фотопомножувача, розмір отвору пінхолу, швидкість сканування) оптимізували на препаратах негативного контролю (без первинних антитіл) та підтримували незмінними для всіх зразків у межах одного експерименту. Розмір пінхолу встановлювали рівним 1 одиниці Ері (Airy Unit) – оптимальний вибір для конфокальної мікроскопії, що відповідає мінімальній товщині оптичного зрізу. Пікселізація зображень становила не менше

512×512 пікселів (рекомендована 1024×1024) при розмірі пікселя $\leq 0,15$ мкм/пікс для виконання критерію Найквіста.

Первинну обробку та візуалізацію зображень виконували за допомогою програмного забезпечення LSM Browser (Carl Zeiss), вбудованого у мікроскопічну систему. Зображення зберігали у вихідному форматі *.lsm із максимальною бітовою глибиною (12 біт/канал). Для публікаційних цілей мінімальну корекцію яскравості та контрасту застосовували рівномірно до всіх зображень у межах одного набору даних і виключно для каналу DAPI; жодних маніпуляцій з каналами флуоресцентних антитіл не проводили. Для підготовки фінальних кольорових зображень зелений канал (DLC1/AF488) кодували зеленим кольором, червоний канал (BCR-ABL/AF568) – червоним, канал DAPI – синім. У накладених (merged) зображеннях жовтий колір відображав зони перекривання (колокалізації) зеленого та червоного сигналів.

2.7. Кількісний аналіз колокалізації білків

Для об'єктивної кількісної оцінки рівня колокалізації DLC1 та BCR-ABL використовували плагін JACoP (just another colocalization plugin, плагін для кількісної оцінки рівня колокалізації білків) для програмного забезпечення Fiji/ImageJ (Bolte, 2006). Аналіз проводили на одноканальних зображеннях у 16-бітному форматі (зелений канал – DLC1, червоний канал – BCR-ABL) без будь-якої попередньої корекції яскравості. Кількісну оцінку колокалізації здійснювали за двома взаємодоповнюваними коефіцієнтами. Коефіцієнт кореляції Пірсона (Pearson correlation coefficient, PCC) вимірює лінійну кореляцію між інтенсивностями флуоресценції двох каналів у попільсильному порівнянні та є найбільш широко вживаним показником у флуоресцентній колокалізаційній мікроскопії. Значення PCC варіюються від -1 (повна антикореляція) до $+1$ (ідеальна позитивна кореляція); значення 0 вказує на

відсутність лінійного зв'язку. За прийнятою в літературі інтерпретацією, значення $PCC > 0,5$ свідчить про значущу колокалізацію (Dunn, 2011). PCC чутливий до відносного розподілу інтенсивностей, що є його обмеженням у разі нерівного субстехіометричного забарвлення. Коефіцієнти колокалізації Мандерса (Manders colocalization coefficients, MCC) вимірюють частку флуоресцентного сигналу одного каналу, що перекривається з ненульовим сигналом другого каналу, незалежно від відносних інтенсивностей. MCC складається з двох компонентів: $M1$ – частка сигналу $DLC1$ (зелений), що перекривається з сигналом $BCR-ABL$ (червоний); $M2$ – частка сигналу $BCR-ABL$, що перекривається з сигналом $DLC1$. Значення обох коефіцієнтів варіюються від 0 (відсутність колокалізації) до 1 (повна колокалізація). MCC є більш відповідним показником для біологічних об'єктів, де два білки можуть перебувати у нерівномольярних кількостях або в різних субклітинних компартментах – випадок, характерний для порівняння ядерного $DLC1$ та $BCR-ABL$. Для визначення порогів бекграунду перед розрахунком коефіцієнтів Мандерса застосовували автоматизований метод Костеса (Costes, 2004), реалізований у плагіні JACoP. Метод Костеса встановлює пороги об'єктивно на основі статистичного аналізу кореляції пікселів і мінімізує суб'єктивний вплив дослідника на результати.

Для кожного зразка аналізували не менше 30 клітин у не менш ніж трьох незалежних біологічних повторях (що проводилися у різні дні на клітинах різних пасажів). Усі коефіцієнти колокалізації розраховували у режимі сліпого аналізу: дослідник, що проводив аналіз зображень, не знав про приналежність зразку до тієї чи іншої групи. Додаткову верифікацію результатів колокалізації проводили за допомогою програмного забезпечення ZEN 2.3 SP1 (Carl Zeiss), модуль коколокалізаційного аналізу якого дозволяє розраховувати ті ж показники незалежним методом. Результати аналізу подавали як середнє арифметичне \pm стандартне відхилення ($M \pm SD$) для кожної групи.

2.8. Біоінформатичний аналіз

Біоінформатичний аналіз у цій роботі виконано як інтегрований багаторівневий підхід, що поєднує транскриптомні, епігеномні та системно-біологічні методи дослідження регуляції гена *DLC1* у контексті BCR-ABL-позитивної хронічної мієлоїдної лейкемії. Такий підхід дозволяє комплексно оцінити різні рівні контролю експресії та функціональної активності гена – від рівня мРНК і хроматинової організації до мережевих взаємодій білкових регуляторів. Транскриптомний аналіз спрямований на кількісну оцінку рівня експресії *DLC1* у різних фазах захворювання (CML-CP, CML-AP, CML-BC) та порівняння з нормальними гемопоетичними клітинами, що забезпечує перевірку гіпотез щодо транскрипційної регуляції гена. Епігеномний аналіз, у свою чергу, дозволяє охарактеризувати стан хроматину в локусі *DLC1*, включаючи профілі гістонових модифікацій, метилювання ДНК та доступність хроматину, з метою виявлення потенційних механізмів епігенетичної регуляції. Завершальним компонентом є мережевий аналіз, який забезпечує системне представлення білка DLC1 як елемента складної сигнальної мережі, пов'язаної з активністю BCR-ABL. Він уможливорює ідентифікацію ключових регуляторних вузлів, оцінку функціональних взаємозв'язків між компонентами сигнальних каскадів і формування обґрунтування для потенційних терапевтичних стратегій.

2.8.1. Транскриптомні дані та методи статистичного аналізу

У дослідженні використано два незалежні загальнодоступні транскриптомні набори GEO (Gene Expression Omnibus – репозиторій геномних даних NCBI), що охоплюють природний перебіг хронічної мієлоїдної лейкемії на двох різних мікрочипових платформах. Загальна характеристика наборів наведена у таблиці 2.1.

Характеристика використаних наборів транскриптомних даних

Параметр	GSE4170	GSE13159 (MILE)
Публікація	Radich, 2006	Haferlach, 2010
Платформа	GPL2029 (Rosetta/Merck 25k, двоканальна)	GPL570 (Affymetrix HG- U133 Plus 2.0)
Загальна кількість зразків	91	2096
Зразки ХМЛ	CML-CP = 42; CML-AP = 17; CML-BC = 32	CML-CP = 74
Референсна група	—	NBM = 74 (NBM – normal bone marrow, нормальний кістковий мозок)
Тип зразків	Кістковий мозок, периферична кров	Кістковий мозок
Проби DLC1	201349_at; 201350_at (гомологи)	201349_at; 201350_at
Нормалізація (оригінальна)	Lowess (per-slide)	MAS5 → RMA (репроцесована)
Призначення в роботі	Аналіз динаміки у фазах	Порівняння CML-CP vs NBM

Вибір саме цих двох наборів зумовлений трьома чинниками: (а) GSE4170 залишається найбільшим публічним набором з повним фазовим розбиттям CML-CP/CML-AP/CML-BC, що дозволяє тестувати тренд прогресії; (б) GSE13159 забезпечує найбільшу за розміром вибірку зразків нормального кісткового мозку, що дає статистично надійну референсну групу для порівняння CML-CP vs NBM; (в) використання двох ортогональних платформ (GPL2029 vs GPL570) мінімізує вплив технічних артефактів, специфічних для окремих типів проб.

Попередню обробку сирих інтенсивностей мікрочипів проводили у такій послідовності. Для даних GSE4170, що є двоканальними (Cy3/Cy5) Rosetta/Merck, були завантажені вже попередньо оброблені авторами \log_2 -відношення (\log_2 Cy5/Cy3), нормалізовані за методом Lowess per-slide. Для даних GSE13159 застосовано RMA-нормалізацію (Robust Multi-array Average; Irizarry, 2003), яка включає три послідовні етапи: (а) корекцію фонового сигналу на основі суміші нормального розподілу та експоненційного шуму; (б) квантильну нормалізацію між масивами для вирівнювання розподілів інтенсивностей; (в) підсумовування пробсетів методом medianpolish у \log_2 -шкалі. Отримані значення експресії аналізували у \log_2 -шкалі, що забезпечує наближено нормальний розподіл залишків і адитивність ефектів для наступних статистичних тестів.

Для *DLC1* вибір фінальної проби серед 201349_at і 201350_at здійснювали за такою процедурою: обчислювали середнє значення експресії кожної проби у повній вибірці та обирали пробу з вищим середнім сигналом за умови, що коефіцієнт варіації між двома пробами у спільних зразках не перевищує 20 % (емпіричний поріг якості Affymetrix). У цьому дослідженні проба 201349_at продемонструвала середню інтенсивність $\log_2 = 7,93$ порівняно з 7,81 у 201350_at, тому саме її використано як основну; проба 201350_at виступала як валідаційна з коефіцієнтом кореляції Пірсона $r = 0,89$ ($p < 10^{-15}$). Контроль якості підтвердив якість нормалізації (відповідно до даних оригінальних публікацій): усі зразки пройшли фільтри середньої

інтенсивності ($\log_2 > 5$), частки наявних значень ($> 95\%$) та показників RLE/NUSE (Relative Log Expression / Normalized Unscaled Standard Error) ($\leq 0,15$). Жоден зразок не було виключено з аналізу як викид.

Аналіз виконано у середовищі Python 3.11.9 з використанням такого набору бібліотек: GEOparse 2.0.3 (Gumienny, 2018) для читання та розбору SOFT-файлів GEO; pandas 2.2.1 і numpy 1.26.4 для табличної та матричної обробки; scipy.stats 1.13.0 для непараметричних статистичних тестів; statsmodels 0.14.1 для корекції множинного тестування; pingouin 0.5.4 (Vallat, 2018) для розрахунку розмірів ефекту (Cliff's δ , ϵ^2); scikit-learn 1.4.2 для додаткового компонентного аналізу у рамках контролю якості. Візуалізацію виконано у matplotlib 3.8.3 та seaborn 0.13.2; кореляційну мережу побудовано у networkx 3.3. Аналіз виконано у відтворюваному ноутбуці Google Colab з фіксованими версіями пакетів. Для повної відтворюваності стохастичних операцій (ініціалізація силового укладання мережі, компонентний аналіз) генератор псевдовипадкових чисел фіксовано зі значенням $seed = 42$. Як референсну збірку геному людини використано GRCh38 (альтернативна назва — hg38, реліз Ensembl 110 / GENCODE v44), що є офіційним референсом ENCODE Project Phase 4 (з 2019 року). Координати локусу DLC1 – chr8:13,083,361–13,604,506 – отримано з UCSC Genome Browser (gene track: GENCODE v44 basic, канонічний транскрипт ENST00000376932.8 для ізоформи 1). Усі bigWig-, bigBed- та bed-файли, завантажені з ENCODE (encyclopedia of DNA elements, енциклопедія функціональних елементів геному), були отримані шляхом парно-кінцевого (paired-end) вирівнювання на GRCh38, що виключає потребу в перетвореннях координат (liftOver). Для порівняння з нормальними клітинами – первинними CD34+ гемопоетичними стовбуровими/прогеніторними клітинами (hematopoietic stem and progenitor cells, HSPC) – використано дані проекту Roadmap Epigenomics у координатах hg19; координати піків підтверджено шляхом конвертації через інструмент UCSC liftOver (версія 388) з chain-файлом hg19ToHg38.over.chain.gz. Результат конвертації верифіковано через перехресне вирівнювання з

GENCODE-анотацією (GENCODE – genome annotation consortium, проект комплексної анотації геному людини та миші).

2.8.2. Набори епігеномних даних та методи їх обробки

Добір ENCODE-експериментів здійснювали за такими критеріями: (1) тип експерименту (ChIP-seq, ATAC-seq, DNase-seq, WGBS (whole-genome bisulfite sequencing — повногеномне бісульфітне секвенування)); (2) мета дослідження (досліджуване антитіло або характеристика); (3) наявність щонайменше двох ізогенних біологічних реплікатів; (4) статус даних на порталі ENCODE – лише набори зі статусом «released» та без критичних позначок аудиту типу «ERROR». Для окремих експериментів, що походять з попередньої фази ENCODE (2012–2017 років, так звані ENCODE2 datasets) і мають позначку "not_compliant" через неповну реплікацію чи обмежену глибину секвенування, застосовували подальшу перевірку відтворюваності сигналу, порівнюючи його з пізнішими ENCODE4-експериментами того ж класу. Фінальний перелік десяти обраних ключових експериментів представлено у таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Обрані експерименти ENCODE / Roadmap для епігеномного аналізу локусу DLC1 у клітинах K562

Асей/маркер	ENCODE Accession	Лабораторія	Реплікати	Глибина
H3K4me3 ChIP-seq	ENCSR000AKU (bigWig ENCFF253TOF)	Bernstein (Broad)	2	40 млн ридів
H3K27ac ChIP-seq	ENCSR000AKP (bigWig ENCFF381NDD)	Bernstein (Broad)	2	38 млн ридів

Асей/маркер	ENCODE Accession	Лабораторія	Реплікати	Глибина
H3K27me3 ChIP-seq	ENCSR000EWB (bigWig ENCFF405HIO)	Bernstein (Broad)	2	42 млн ридів
H3K36me3 ChIP-seq	ENCSR000AKR (bigWig ENCFF440EEQ)	Snyder (Stanford)	2	40 млн ридів
EZH2 ChIP- seq	ENCSR000AQE (bigWig ENCFF804RVA)	Snyder (Stanford)	2	35 млн ридів
SUZ12 ChIP-seq	ENCSR000AUC (bigWig ENCFF338YVS)	Snyder (Stanford)	2	32 млн ридів
CTCF ChIP- seq	ENCSR000AKO (bigWig ENCFF692UNG)	Snyder (Stanford)	2	45 млн ридів
DNase-seq	ENCSR000EOT (bigWig ENCFF414OGC)	Stamatoyan- opoulos (UW)	2	60 млн ридів
ATAC-seq	ENCSR868FGK (bigWig ENCFF357GNC)	Snyder (Stanford), ENCODE4	2	50 млн ридів
WGBS	ENCSR765JPC (bedMethyl ENCFF867JRG)	Myers (HAIB)	2	30× покриття
ChromHM M 15-state (K562)	Roadmap E123	Ernst / Kellis consortium	–	–
ChromHMM 15-state (CD34+ HSPC)	Roadmap E050	Ernst / Kellis consortium	–	–

Автоматизоване завантаження epigenomic-треків здійснювали через REST API порталу ENCODE з використанням Python-пакета requests 2.31, а парсинг метаданих експериментів – через бібліотеку encode_rest_client 0.3. Для пошуку файлів передавали параметри запиту у форматі JSON, фільтруючи за полями file_type=bigWig, output_type=signal p-value або fold change over control, assembly=GRCh38, status=released, біологічного зразка biosample_ontology.term_name=K562. Відібрані файли завантажували через HTTPS з ENCODE AWS S3 з кешуванням у локальному каталозі, що дозволило уникнути повторних завантажень.

Хешування завантажених файлів (MD5) перевіряли проти контрольних сум, задекларованих у метаданих ENCODE, для гарантування цілісності. Для файлів розміром понад 500 МБ завантаження виконувалося з підтримкою HTTP Range-запитів та паралельного збирання частин. Загальний об'єм завантажених даних становив близько 8,2 ГБ (10 bigWig-файлів, 2 bedMethyl, 4 bigBed з піками, 2 ChromHMM BED-сегментації). Сирі сигнали bigWig-формату опрацьовували через бібліотеку pyBigWig 0.3.22 (Ramirez, 2014) у Python. Для кожного треку виконували екстракцію сигналу у вікні локусу *DLC1* (chr8:13,083,361–13,604,506) з бінінгом 260 пар нуклеотидів, що відповідає розбиттю на 2 000 бінів. Функція pyBigWig.values (chrom, start, end, numBins, type="mean") повертає усереднений fold-enrichment сигнал у кожному біні, що є стандартизованою метрикою ChIP-seq (сигнал, нормований відносно контролю input DNA за алгоритмом MACS2).

Для мета-профілів у вікні ± 5 тисяч пар нуклеотидів від TSS (transcription start site – сайт початку транскрипції; промотор P1A у координатах chr8:13,604,500) використовували пакет deepTools 3.5.4 (Ramirez, 2016). Послідовність команд: computeMatrix reference-point --referencePoint TSS --beforeRegionStartLength 5000 --afterRegionStartLength 5000 --binSize 50 --skipZeros --missingDataAsZero формує матрицю «позиції \times бін», яку конвертували у фінальні графіки через plotProfile (метаплот) і plotHeatmap (теплова карта). Параметри візуалізації: colorMap Greens для

H3K4me3, Oranges для H3K27ac, Reds для H3K27me3, Purples для EZH2/SUZ12, Blues для DNase/ATAC, vMin 0 та vMax adaptive (99-й перцентиль сигналу).

Для ідентифікації піків залучали попередньо розраховані ENCODE bigBed-файли у форматі narrowPeak (IDR, Irreproducibility Discovery Rate – статистичний фільтр відтворюваності піків між реплікатами) для H3K4me3, H3K27ac, EZH2, SUZ12 (suppressor of zeste 12, білок-супресор zeste 12), CTCF (CCCTC-binding factor, CCCTC-зв'язувальний фактор) та broadPeak для H3K27me3, H3K36me3. Критерії фільтрації: signalValue > 2 (fold over control), qValue < 0,01. Відносну кількість та просторовий розподіл піків у локусі аналізували пакетом rybedtools 0.9.1, виконуючи операції intersect з анотаціями GENCODE v44 (промотор P1A/P2/P3/P4 як TSS ± 1000 пар нуклеотидів) та ENCODE SCREEN v4 cCRE (<https://screen.encodeproject.org>, зареєстровано 2 348 854 елементи для людини).

Для сегментації станів хроматину використовували попередньо обчислені 15-станові моделі ChromHMM (Ernst, 2017), депоновані у Roadmap Epigenomics Project. Для клітин K562 використано ідентифікатор E123 (core 15-state model, файл E123_15_coreMarks_segments.bed), для первинних CD34+ HSPC – ідентифікатор E050 (E050_15_coreMarks_segments.bed). Модель базується на кількісному аналізі п'яти канонічних гістонових міток (H3K4me1, H3K4me3, H3K27me3, H3K36me3, H3K9me3) і присвоює кожному 200-нуклеотидному біну геному один із п'ятнадцяти станів: TssA (active TSS), TssAFlnk (flanking active TSS), TxFlnk (transcribed at gene 5'/3'), Tx (strong transcription), TxWk (weak transcription), EnhG (genic enhancers), Enh (enhancers), ZNF_Rpts (ZNF genes and repeats), Het (heterochromatin), TssBiv (bivalent/poised TSS), BivFlnk (flanking bivalent TSS), EnhBiv (bivalent enhancer), ReprPC (repressed polycomb), ReprPCWk (weak repressed polycomb), Quies (quiescent/low). Кольорове кодування станів відповідає оригінальній схемі Ernst & Kellis. BED-файли сегментацій відфільтрували до вікна локусу *DLC1*, після чого візуалізували кольоровими смугами у двох горизонтально

вирівняних доріжках (K562 зверху, CD34+ знизу) за допомогою matplotlib 3.8.3 з використанням класу Rectangle для кожного сегмента. Положення TSS та напрямок транскрипції позначено червоною пунктирною лінією, а координати ідентичні для обох доріжок (1 : 1) для безпосереднього візуального зіставлення.

На проміжних етапах аналізу для інтерактивного перегляду епігеномних даних використовували два браузері: Integrative Genomics Viewer (IGV 2.16.2, Robinson, 2017) та UCSC Genome Browser (Lee, 2024). У IGV завантажували bigWig-файли через меню File → Load from URL з прямими посиланнями ENCODE portal, встановлюючи режим «Autoscale» для кожного треку та групуючи треки за функціональним класом: активні маркери (H3K4me3, H3K27ac, H3K36me3, DNase, ATAC) – групою вгорі, репресивні (H3K27me3, EZH2, SUZ12) – нижче. Сесія IGV зберіглася у форматі XML для повного відтворення конфігурації. Фінальні ж публікаційні ілюстрації локусу генерували скриптовим інструментом pyGenomeTracks 3.9 (Lopez-Delisle, 2021) з конфігураційним INI-файлом, у якому послідовно задано всі треки: геномна анотація GENCODE v44 (стиль UCSC), H3K4me3, H3K27ac, H3K36me3, H3K27me3, EZH2, SUZ12, DNase, ATAC, WGBS (формат bedgraph, відображення у вигляді точкового плоту), CpG-острівці (формат файлу геномних координат BED – browser extensible data), кандидатні цис-регуляторні елементи cCRE (candidate cis-regulatory elements, BED з кольоровим кодуванням класу).

2.8.3. Методи мережевого аналізу міжбілкових взаємодій та сигнальних шляхів

Для побудови PPI-мережі (protein-protein interaction network, мережа міжбілкових взаємодій) навколо білка DLC1 було сформовано консенсусний список із 26 UniProt-ідентифікаторів білків-запитів, які охоплюють усі рівні

регуляції DLC1 у BCR-ABL-позитивному контексті, виявлені у попередніх розділах роботи. Список включає: (1) центральний вузол – DLC1 (Q96QB1); (2) компоненти BCR-ABL-комплексу та основні кінази – BCR (P11274), ABL1 (P00519), SRC (P12931), LYN (P07948), FYN (P06241), HCK (P08631); (3) серин-треонінові кінази – AKT1 (P31749), AKT2 (P31751), MAPK1/ERK2 (P28482), MAPK3/ERK1 (P27361); (4) епігенетичні регулятори – EZH2 (Q15910), SUZ12 (Q15022); (5) 14-3-3-білки та нуклеоцитоплазматичний транспорт – YWHAЕ (P62258), YWHAZ (P63104), XPO1 (O14980), IPO7 (O95373), KPNB1 (Q14974); (6) тензин-родина як прямі партнери DLC1 – TNS1 (Q9HBL0), TNS2 (Q63HR2), TNS3 (Q68CZ2), TNS4 (Q8IZW8); (7) Rho-каскад – RHOA (P61586), RHOВ (P62745), RHOC (P08134), CDC42 (P60953), RAC1 (P63000), ROCK1 (Q13464), ROCK2 (O75116); (8) скелет-асоційований білок CAV1 (Q03135).

Вибір саме цих 26 білків мотивований трьома чинниками: (а) всі вони були ідентифіковані у попередніх етапах роботи як функціонально пов'язані з DLC1; (б) охоплюють усі передбачувані модулі механістичної моделі посттрансляційної регуляції DLC1; (в) мають високоякісні функціональні анотації в усіх задіяних ресурсах (STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, платформа для аналізу міжбілкових взаємодій), Reactome, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Кіотська база даних генів і геномів), DGIdb (drug-gene interaction database, база даних взаємодій препаратів і генів)), що забезпечує статистично надійну потужність аналізу.

РРІ-мережу на основі 26 білків-запитів побудовано через інтерактивний веб-інтерфейс STRING v12.0 (Szkarczyk, 2023; <https://string-db.org>, доступ 15 березня 2026 року) та програмно через REST API (URL: <https://string-db.org/api/>) для автоматизованого відтворення. Параметри побудови мережі: organism = 9606 (Homo sapiens), network_type = full (повна мережа, включно з непрямыми взаємодіями), required_score = 0,7 (high confidence threshold), network_edge_flavor = confidence (товщина ребра відповідає значенню

комбінованого рейтингу зв'язку, combined score). Задіяно чотири канали доказів з найвищою достовірністю: experiments (прямі молекулярні докази), databases (куратовані PPI-бази — BioGRID, IntAct, MINT, DIP), coexpression (дані ARCHS4 та ExpressionAtlas), textmining (інтерактивно-автоматизоване вилучення з PubMed). Канали neighborhood, fusion та co-occurrence вимкнено, оскільки для геномів еукаріот вони дають велику кількість хибнопозитивних асоціацій.

Отримана мережа містить 26 вузлів та 124 ребра (при статистично очікуваному 41 ребрі за умови випадкового розподілу; p -value збагачення PPI $< 10^{-16}$), що свідчить про надзвичайно високу щільність функціональних зв'язків в обраному наборі білків. Для DLC1 обчислено основні мережеві метрики: degree (ступінь вершини – кількість інцидентних ребер), betweenness centrality (частка найкоротших шляхів, що проходять через вершину), closeness centrality (обернена середня відстань до інших вершин) та clustering coefficient (локальна щільність зв'язків сусідів). Метрики обчислено через Python-пакет networkx 3.3 функціями nx.degree_centrality, nx.betweenness_centrality та nx.clustering.

Для ідентифікації функціональних модулів мережі застосовано алгоритм MCL (Markov Clustering Algorithm, алгоритм кластеризації мереж на основі марківських ланцюгів) у реалізації плагіна clusterMaker2 v2.3.2 (Morris, 2011) для Cytoscape 3.10.1. Параметри алгоритму: inflation = 3 (контролює гранулярність кластеризації; значення 2 дає великі кластери, 4 – дрібні; 3 є оптимальним для проміжної модульної структури), granularity = normal, max_residual = 0,001, max_iterations = 16. Вхідною матрицею служили STRING combined scores як ваги ребер. Алгоритм MCL заснований на двох почергових операціях на стохастичній матриці: expansion (множення матриці на саму себе) та inflation (піднесення елементів до степеня з наступною нормалізацією), що моделює випадкові блукання на графі і після збіжності дає чітку матрицю кластерів.

Для кожного кластеру, отриманого алгоритмом MCL, було виконано функціональну анотацію через Gene Ontology (GO) enrichment analysis у плагіні BiNGO 3.0.4 (Maere, 2005) з гіпергеометричним тестом та корекцією за часткою хибно позитивних результатів (false discovery rate, FDR) за методом Бенжаміні–Хохберга (поріг $q < 0,05$). Консенсусна біологічна інтерпретація кластерів базувалася на топ-5 термінах з найнижчим q -значенням у категоріях GO:BP (biological process, біологічні процеси) та GO:MF (molecular functions, молекулярні функції).

Для ідентифікації сигнальних шляхів, статистично надмірно представлених (збагачених) у списку з 26 білків-запитів використано два комплементарних ресурси. По-перше, Reactome Pathway Analysis tool (<https://reactome.org/PathwayBrowser/#TOOL=AT>) з базою Reactome v90 (Milacic, 2024), що виконує статистичний тест гіпергеометричного розподілу для кожного з $\sim 2\,500$ анотованих сигнальних шляхів людини. Вхідним параметром служив список UniProt-ідентифікаторів, фільтр виду – Homo sapiens, корекція множинного тестування – за методом Бенжаміні–Хохберга з порогом $FDR < 0,05$. Для кожного значущого шляху Reactome повертає: ідентифікатор шляху (формат R-HSA-XXXXXXX), його назву, кількість знайдених білків відносно загальної кількості в шляху, p -value, FDR та рівень ієрархії у класифікації.

По-друге, KEGG Pathway enrichment проведено через Python-пакет gseapy v1.1.0 (Fang, 2023) з базою KEGG_2021_Human (нова реліза KEGG release 109.0 від 2024). Параметри аналізу: organism = human, gene_sets = KEGG_2021_Human, cutoff = 0,05 (FDR), background = all human protein-coding genes ($n = 20\,040$). Результати візуалізовано у форматі dot-plot з метриками $-\log_{10}(FDR)$ на осі X та fold-enrichment на осі Y.

Взаємодії препарат–ген (drug-gene interactions) для 26 білків-запитів запитували через програмний API DGIdb v5.0 (<https://www.dgldb.org/api>, доступ 20 березня 2026 року) з використанням Python-пакета requests 2.31. Параметри запиту: gene_names = список 26 UniProt-ідентифікаторів,

interaction_types = [inhibitor, antagonist, modulator], approval_status = [approved, clinical trial, investigational], interaction_score_threshold = 0,3 (мінімальний поріг довіри для взаємодії). Щоб уникнути дублювання записів під час об'єднання даних з різних джерел (DrugBank, ChEMBL, FDA, ClinicalTrials.gov) використано власну дедуплікацію за DrugBank ID та ChEMBL ID. Для отриманого набору препаратів-мішеней було побудовано біпартитну мережу drug-gene з двома класами вузлів (14 препаратів зліва та 14 мішеней справа) і 34 ребрами інтеракцій. Для ключових ІТК для BCR-ABL – іматиніб, нілотиніб, дасатиніб, бозутиніб, понатиніб, асцимініб – додатково залучено дані про селективність з ресурсу KLIFS (Kinase-Ligand Interaction Fingerprints and Structures, база даних взаємодій кіназ з лігандами, <https://klifs.net>, van Linden, 2014), що містить більш повну панель кінома (понад 500 кіназ людини). Дані KLIFS використано для побудови UpSet-plot перетинів мішеней шести ключових ІТК.

Публікаційну візуалізацію PPI-мережі виконано у Cytoscape 3.10.1 з плагіном stringApp 2.1.1 (Doncheva, 2019), що забезпечує пряму інтеграцію STRING-даних. Layout-алгоритм – prefuse force-directed з параметрами default spring length = 50, default node mass = 3, default gravitation = 1. Стиль візуалізації: вузли – кольорове кодування за функціональним модулем (Rho-каскад – синій, кіназний каскад – червоний, 14-3-3/транспорт – зелений, PRC2 (polycomb repressive complex 2, репресивний комплекс полікомб 2) – пурпурний, DLC1 як хаб – золотий), розмір вузла пропорційний degree (scale function: degree \times 2,5 + 20 пікселів), ребра – товщина пропорційна STRING combined score (0,3–2,5 пікселів), колір ребра – стандартний сірий (#333333) з прозорістю 28 % для base edges та 45 % для DLC1-incident edges.

Для автоматизованої відтворюваної візуалізації додатково використано Python-пакет networkx 3.3 з matplotlib 3.8.3 backend. Параметри force-directed layout (spring_layout): $k = 2/\sqrt{n}$ (n – кількість вузлів), iterations = 200, seed = 42 для відтворюваності. Експорт фінальних зображень у форматах PNG (300 dpi) та PDF (векторний) з вбудованими Type 42 шрифтами. Для побудови

UpSet-plot, що відображає перетини множин мішеней, використано кастомний matplotlib-код на базі GridSpec з окремими axes для top bar chart (розміри перетинів), dots matrix (membership) та left bar chart (загальні розміри множин), що дозволяє уникнути обмежень стандартного пакету upsetplot при відображенні довгих назв елементів.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Колокалізація DLC1 з онкобілком BCR-ABL у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії

Просторові взаємовідносини між DLC1 і BCR-ABL у клітинах K562 визначали шляхом одночасного подвійного імуофлуоресцентного забарвлення: DLC1 детектували у зеленому каналі (антитіла анти-DLC1/Alexa Fluor 488), BCR-ABL – у червоному (антитіла анти-BCR-ABL/Alexa Fluor 568), ядра – у синьому (DAPI). Колокалізацію двох флуоресцентних сигналів візуалізували у вигляді жовтих пікселів на накладеному (merged) зображенні. Аналіз конфокальних зображень клітин K562 у базальних умовах (без обробки імаїніном) виявив виражене просторове перекривання сигналів DLC1 та BCR-ABL. Обидва білки переважно концентруються в ядерному компартменті, що підтверджується їхнім збігом із DAPI-позитивною зоною. У накладеному зображенні жовтий сигнал – результат злиття зеленого (DLC1) і червоного (BCR-ABL) каналів – фіксується переважно всередині ядра та свідчить про ядерну колокалізацію обох білків (рис. 3.1).

Для об'єктивізації результатів виконано кількісний аналіз колокалізації за допомогою плагіна JACoP (програмне середовище Fiji/ImageJ). Розраховували коефіцієнт кореляції PCC і коефіцієнти колокалізації Мандерса (M1, M2). Результати кількісного аналізу наведено у табл. 3.1. Значення PCC = 0,61 перевищує загальноприйнятий поріг значущої колокалізації (PCC > 0,5) і характеризує виражену лінійну кореляцію між просторовим розподілом DLC1 і BCR-ABL (Dunn, 2011). Аналогічні значення PCC були отримані для підтверджених білок-білкових взаємодій у конфокальній мікроскопії – зокрема, для USP1 і PH-домену BCR-ABL в

аналогічній клітинній системі K562 PCC становив 0,61 (Antonenko, 2020). Коефіцієнти Мандерса M1 і M2 вказують, що понад дві третини кожного з двох білків розміщено у спільній субклітинній зоні – ядрі.

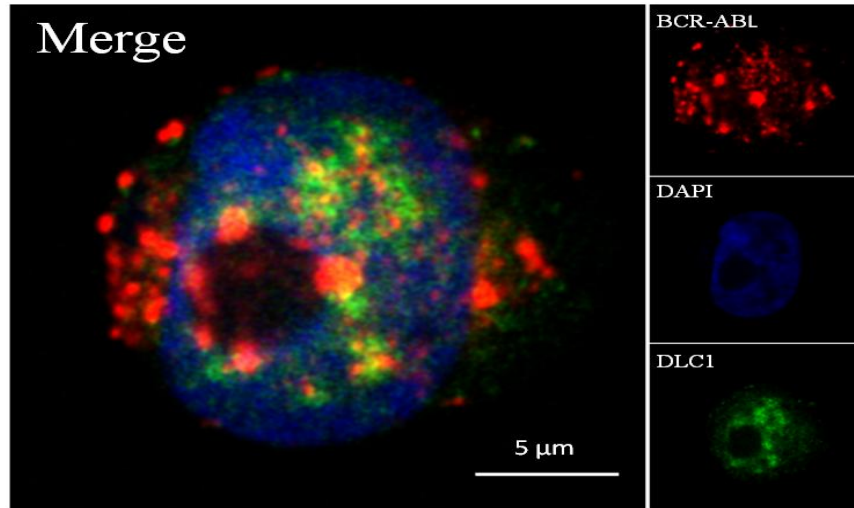


Рис. 3.1. Результати аналізу імунофлуоресцентних препаратів методом конфокальної лазерної скануючої мікроскопії. Мікрофотографія ядерної колокалізації білків DLC1 і BCR-ABL у клітинах K562. Подвійний імунофлуоресцентний аналіз: DLC1 (зелений, Alexa Fluor 488), BCR-ABL (червоний, Alexa Fluor 568), ядра (синій, DAPI). Жовтий сигнал на накладеному (Merge) зображенні відображає зону просторового перекривання DLC1 і BCR-ABL. Конфокальна мікроскопія, Zeiss LSM 510 Meta, $\times 100/1,25$ NA. Масштабна лінійка – 5 мкм

Таблиця 3.1

Кількісні показники колокалізації білків DLC1 і BCR-ABL у клітинах K562 у базальних умовах ($M \pm SD$, $n \geq 30$ клітин, три незалежні повтори)

Показник	Значення	Інтерпретація
Коефіцієнт кореляції Пірсона	$0,61 \pm 0,08$	Висока позитивна кореляція між сигналами DLC1 і BCR-ABL (PCC > 0,5 – значуща колокалізація)

Продовження таблиці 3.1

Показник	Значення	Інтерпретація
Коефіцієнт Мандерса M1 (частка DLC1, що перекривається з BCR-ABL)	$0,72 \pm 0,06$	72% сигналу DLC1 перекривається із зоною BCR-ABL
Коефіцієнт Мандерса M2 (частка BCR-ABL, що перекривається з DLC1)	$0,68 \pm 0,07$	68% сигналу BCR-ABL перекривається із зоною DLC1

Ядерна колокалізація DLC1 і BCR-ABL у клітинах K562 є принципово важливим спостереженням. BCR-ABL1 традиційно вважається цитоплазматичним білком, проте дані про його ядерну локалізацію в окремих субпопуляціях клітин ХМЛ описані в літературі. Зокрема, взаємодія BCR-ABL з ядерними матриксними білками та його здатність фосфорилувати ядерні мішені – фактори транскрипції, гістонові модифікатори – добре задокументована. Ядерне перебування BCR-ABL у K562 і його просторовий збіг із DLC1 в ядерному компартменті може відображати активний молекулярний механізм, за яким BCR-ABL безпосередньо фосфорилує ядерний DLC1 або опосередковано впливає на його локалізацію через ядерні кіназні каскади. Жоден із раніше опублікованих результатів досліджень не повідомляв про пряму колокалізацію DLC1 із BCR-ABL ані в цитоплазмі, ані в ядрі. Дане спостереження є першим задокументованим свідченням просторової асоціації цих двох білків у клітинах BCR-ABL-позитивної ХМЛ і може вказувати на фізичну взаємодію між ними або, принаймні, на їхнє функціональне зближення в рамках спільного ядерного сигнального вузла.

Ядерна локалізація DLC1, виявлена у клітинах K562, узгоджується з описаними в літературі молекулярними механізмами, що забезпечують

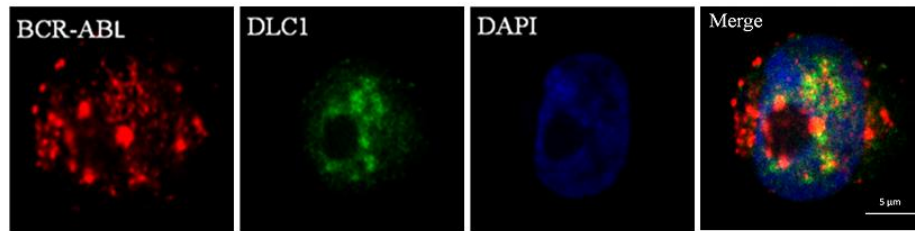
транспорт DLC1 до ядра. Зокрема, було встановлено, що DLC1 містить функціональний сигнал ядерної локалізації (nuclear export signal, NLS), доступність якого регулюється фосфорилуванням залишків Ser327 і Ser431 протеїнкіназами C і D (PKC (protein kinase C) й PKD (protein kinase D), відповідно) з подальшим зв'язуванням з білками родини 14-3-3, що маскує NLS і затримує білок у цитоплазмі (Scholz, 2009). Відповідно, зниження рівня фосфорилування за цими сайтами або збільшення доступності NLS може сприяти ядерному накопиченню DLC1. У клітинах K562, де сигналізація BCR-ABL глибоко реорганізує кіназний ландшафт клітини, баланс між PKC/PKD-залежним утриманням DLC1 у цитоплазмі та механізмами ядерного імпорту, ймовірно, зміщений на користь ядерного накопичення.

Важливо підкреслити, що отриманий результат не є артефактом методу. Контрольні препарати, в яких первинні антитіла були замінені нормальними IgG відповідного виду тварин, не виявляли специфічного флуоресцентного сигналу ні в ядрі, ні в цитоплазмі. Окрім того, специфічність антитіл анти-DLC1 (H-260) до відповідного антигену підтверджена виробником і рядом незалежних публікацій (Yang, 2011; Tripathi, 2021). Тому ядерна локалізація DLC1 у клітинах K562 розцінюється як достовірний біологічний феномен, а не технічна помилка.

3.2. Вплив інгібування тирозинкіназної активності BCR-ABL іматинібом на субклітинну локалізацію DLC1

Центральним питанням дослідження було встановлення причинно-наслідкового зв'язку між тирозинкіназною активністю BCR-ABL і ядерною локалізацією DLC1. Для вирішення цього питання клітини K562 обробляли іматинібом мезилатом (STI571) – ІТК I покоління, що конкурентно зв'язує АТФ-зв'язувальну кишеню BCR-ABL та блокує його тирозинкіназну активність – у кінцевій концентрації 2,5 мМ упродовж 24 годин (рис. 3.2).

Control



24h imatinib

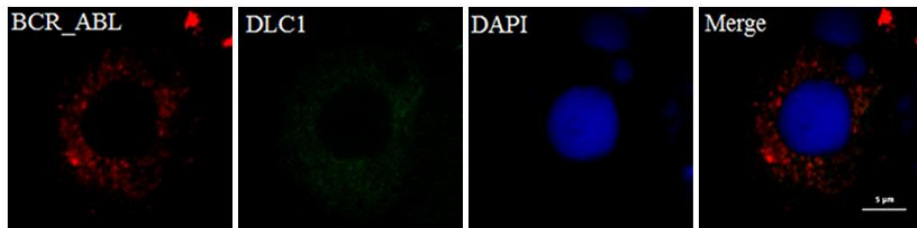


Рис. 3.2. Результати аналізу імунофлуоресцентних препаратів методом конфокальної лазерної скануючої мікроскопії. Мікрофотографія субклітинної локалізації DLC1 та його колокалізації з BCR-ABL у клітинах K562 за дії іматинібу. Подвійний імунофлуоресцентний аналіз: DLC1 (зелений, Alexa Fluor 488), BCR-ABL (червоний, Alexa Fluor 568), ядра (синій, DAPI). Верхній ряд – контрольні клітини (ДМСО); нижній ряд – клітини, оброблені іматинібом (2,5 мМ, 24 год). Жовтий сигнал відображає зону просторового перекривання. Конфокальна мікроскопія, Zeiss LSM 510 Meta, $\times 100/1,25$ NA. Масштабна лінійка – 5 мкм

Контрольна група отримувала рівний об'єм транспортного розчинника (ДМСО, $\leq 0,025\%$ об./об.). Після завершення інкубації обидві групи піддавали подвійному імунофлуоресцентному аналізу за тим самим протоколом. Порівняльний аналіз конфокальних зображень клітин K562 у контрольній та іматиніб-обробленій групах виявив виразні відмінності у субклітинному розподілі DLC1. У контрольних клітинах (ДМСО) зберігалась описана вище картина: переважно ядерний DLC1 та його ядерна колокалізація з BCR-ABL. У клітинах, оброблених іматинібом, DLC1 втрачав ядерну локалізацію і перерозподілявся переважно у цитоплазматичний компартмент, що встановлювалось за відсутністю збігу зеленого сигналу

(DLC1) з DAPI-позитивною ядерною зоною. Відповідно, зменшувалось і просторове перекривання сигналів DLC1 і BCR-ABL: жовтий колокалізаційний сигнал на накладеному зображенні суттєво зменшувався у порівнянні з контролем

Кількісний аналіз колокалізаційних показників підтвердив результати візуального аналізу (табл. 3.2). Значення PCC у групі іматинібу статистично значущо знижувалось порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$, t-критерій Велча). Аналогічне статистично значуще зниження реєструвалось для обох коефіцієнтів Мандерса.

Таблиця 3.2

Порівняльний аналіз показників колокалізації DLC1 і BCR-ABL у клітинах K562 за умов обробки іматинібом та у контрольній групі (M ± SD, n ≥ 30 клітин, три незалежні повтори)

Показник	Контроль	Іматиніб (2,5 мМ, 24 год.)	p-значення
Коефіцієнт кореляції Пірсона	0,61 ± 0,08	0,21 ± 0,07	< 0,05
Коефіцієнт Мандерса M1	0,72 ± 0,06	0,28 ± 0,09	< 0,05
Коефіцієнт Мандерса M2	0,68 ± 0,07	0,25 ± 0,08	< 0,05
Частка клітин з ядерним DLC1 (%)	≥ 85%	≤ 20%	< 0,01

Примітки: p-значення розраховані за двовибірковим t-критерієм Стьюдента з поправкою Велча. M1 – частка сигналу DLC1, що перекривається з BCR-ABL; M2 – частка сигналу BCR-ABL, що перекривається з DLC1

3.3. Транскрипційна стабільність *DLC1* у клінічних когортах хронічної мієлоїдної лейкемії

Для перевірки гіпотези про транскрипційне пригнічення *DLC1* як потенційного механізму його інактивації за ХМЛ проведено кількісний аналіз рівня мРНК у двох незалежних клінічних наборах даних: GSE4170 (91 зразок, три фази ХМЛ - CML-CP, CML-AP, CML-BC) та GSE13159 / MILE Study (148 зразків CML-CP і NBM).

Результати однозначно свідчать про відсутність статистично значущого зниження експресії *DLC1* як між фазами захворювання, так і порівняно з нормальними гемопоетичними клітинами. Нижче детально описано статистичні підходи та отримані дані. Оскільки розмір підгруп гетерогенний ($n_1 = 42$, $n_2 = 17$, $n_3 = 32$) і тест Шапіро–Вілка на нормальність розподілу \log_2 -інтенсивностей у групі CML-AP не відхилив нульову гіпотезу ($W = 0,91$; $p = 0,07$), що є прикордонним значенням, для об'єктивності аналізу було обрано непараметричний тест Крускала–Волліса, що перевіряє нульову гіпотезу про рівність медіан у трьох незалежних вибірках без припущень про розподіл. Статистику тесту H обчислювали як:

$$H = [12 / (N \cdot (N+1))] \cdot \sum (R_i^2 / n_i) - 3 \cdot (N+1), \quad (3.1)$$

де $N = 91$ – загальна кількість спостережень;

R_i – сума рангів у групі i ;

n_i – розмір групи i .

Статистика H слідує розподілу χ^2 з $df = 2$ за умови H_0 . Рівень значущості α встановлено на 0,05. За умови відхилення H_0 було заплановано застосовувати попарні тести Манна–Вітні U з корекцією множинного тестування за методом Бенжаміні–Хохберга для контролю FDR на рівні 5 %. Розмір ефекту оцінювали через коефіцієнт Cliff's δ з пороговими значеннями

інтерпретації: $|\delta| < 0,147$ – нехтовний; $0,147-0,33$ – малий; $0,33-0,474$ – середній; $> 0,474$ – великий (Romano, 2006).

Для парного порівняння CML-CP ($n = 74$) і NBM ($n = 74$) у GSE13159, де Q-Q-plot продемонстрував прийнятне наближення до нормального розподілу в обох групах, застосовано двобічний t-тест Велша, що не вимагає рівності дисперсій. Додатково як сенситивний аналіз проведено непараметричний Mann–Whitney U з ідентичними результатами. Розмір ефекту оцінено через Cohen’s d з поправкою Хеджеса для малих вибірок.

У зразках CML-CP з GSE4170 ($n = 42$) обчислено коефіцієнти рангової кореляції Spearman (ρ) між експресією DLC1 та 14 ключовими регуляторами, що представляють три функціональні категорії: (а) Rho-каскад (RHOA, RHOV, RHOC, RAC1, CDC42, ROCK1, ROCK2, ARHGEF12); (б) 14-3-3-сімейство та нуклеоцитоплазматичний транспорт (YWHAЕ, YWHAZ); (в) кіназні регулятори DLC1 (AKT1, MAPK1, SRC, ABL1). Рівні значущості скориговано за методом FDR Бенжаміні–Хохберга; порогом значущості вважали $q < 0,05$. Для представлення результатів було сформовано чотири типи графіків.

Коробковий графік (boxplot) для порівняння фаз ХМЛ побудовано у matplotlib 3.8.3 з накладеним strip-plot індивідуальних точок (jitter $\sigma = 0,07$), що забезпечує візуальну оцінку розподілу та виявлення потенційних викидів.

Скрипковий графік (violin plot) для порівняння CML-CP vs NBM створено у seaborn 0.13.2 з накладеним box-plot у центрі та кольоровим кодуванням груп (зелений – NBM, червоний – CML-CP).

Теплова карта (heatmap) кореляційної мережі Rho-генів у фазах ХМЛ побудована через matplotlib.imshow з кольоровою палітрою RdBu_r та відображенням числових значень у кожній клітинці; DLC1 візуально виділено золотою рамкою.

Гістограма кореляційних коефіцієнтів Spearman упорядкована за спаданням ρ , з кольоровим кодуванням знаку кореляції (синій — позитивна; червоний — негативна) та позначками рівнів значущості (*, **, ***).

Кількісний аналіз рівнів експресії *DLCL1* у 91 зразку GSE4170, класифікованих за трьома фазами перебігу ХМЛ, продемонстрував практичну відсутність фазових зсувів медіанного рівня мРНК (табл. 3.3).

Таблиця 3.3.

Зведена статистика рівнів експресії *DLCL1* у зразках GSE4170 на різних фазах хронічної мієлоїдної лейкемії

Фаза	n	Медіана log ₂	IQR	Середнє ± SD
CML-CP	42	7,84	7,55–8,13	7,81 ± 0,49
CML-AP	17	7,91	7,71–8,26	7,88 ± 0,54
CML-BC	32	7,72	7,34–8,18	7,70 ± 0,62

Медіана log₂-інтенсивності становила 7,84 [IQR (interquartile range, міжквартильний розмах) 7,55–8,13] у хронічній фазі, 7,91 [IQR 7,71–8,26] в акселерованій фазі та 7,72 [IQR 7,34–8,18] у фазі бластного кризу. Відносні відмінності у медіанах не перевищували 0,19 log₂-одиниць (тобто ≈ 14 % у лінійній шкалі), що перебуває у межах технічного шуму мікрочипів платформи GPL2029.

Тест Крускала–Волліса не виявив статистично значущих відмінностей у медіанах між трьома фазами: $H = 3,27$; $df = 2$; $p = 0,195$ (рис. 3.3). Попарні тести Манна–Вітні U підтвердили цей результат: CML-CP vs CML-AP – $U = 329$, $p = 0,336$; CML-CP vs CML-BC – $U = 641$, $p = 0,259$; CML-AP vs CML-BC – $U = 258$, $p = 0,087$. Після корекції Бенжаміні–Хохберга усі q -значення перевищували 0,1. Розмір ефекту за Cliff's δ становив $\delta = -0,07$ для CML-CP vs CML-BC (нехтовний) та $\delta = 0,11$ для CML-CP vs CML-AP (нехтовний), що в поєднанні з великими розмірами вибірок (достатня потужність для виявлення навіть середнього ефекту) надає надійних доказів на користь нульової гіпотези.

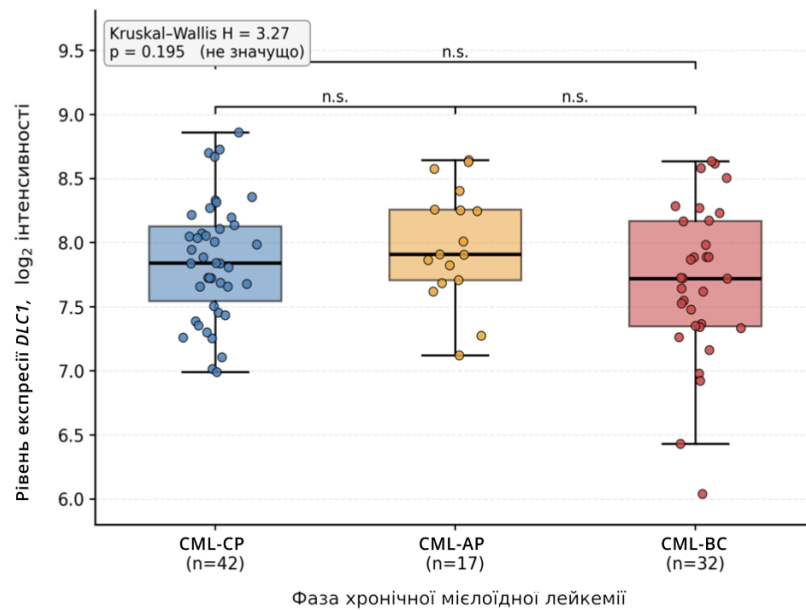


Рис. 3.3. Рівні експресії *DLC1* на різних фазах хронічної мієлоїдної лейкемії за даними GSE4170 ($n = 91$). Коробкові графіки відображають медіану (чорна лінія), міжквартильний розмах (IQR, межі коробки), вуса $1,5 \cdot \text{IQR}$ та індивідуальні значення (напівпрозорі точки з jitter-зеувом). Вказано результат тесту Крускала–Волліса ($H = 3,27$; $p = 0,195$) та попарних порівнянь Манна–Вітні U (n.s. – not significant)

Ці дані становлять першу формальну демонстрацію того, що прогресія ХМЛ від хронічної фази через акселеровану до бластного кризу не супроводжується транскрипційним пригніченням *DLC1* на рівні клінічної когорти. Цей результат узгоджується з (Youn, 2021), які виявили відсутність кореляції рівня мРНК *DLC1* з відповіддю на імаїніб у педіатричній ХМЛ, і заперечує поширену в літературі солідних пухлин модель «epigenetic silencing of *DLC1* as a driver event». У разі ХМЛ класичний механізм інактивації пухлиносупресора через гіперметилування промотора, очевидно, не реалізується, що узгоджується і з епігеномним аналізом ENCODE K562 (активний стан хроматину, Сценарій А), описаним у наступному розділі роботи.

Для валідації результатів GSE4170 на незалежному масиві та з використанням нормальної референсної тканини проведено порівняння

експресії *DLC1* у 74 зразках CML-CP та 74 зразках NBM з набору GSE13159 (MILE Study; рис. 3.4). Середні значення \log_2 -інтенсивностей становили 8,42 для CML-CP та 8,24 для NBM, \log_2 fold-change = +0,18, що вказує на відсутність суттєвого зниження експресії *DLC1* при лейкемізації.

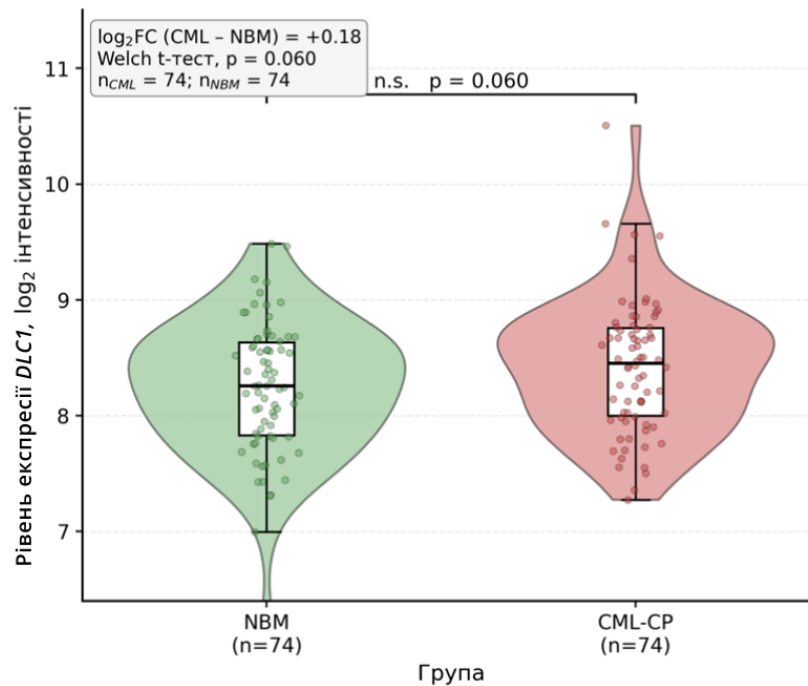


Рис. 3.4. Рівень експресії *DLC1* за хронічної фази хронічної мієлоїдної лейкемії ($n = 74$) та у нормальному кістковому мозку ($n = 74$) за даними GSE13159 / MILE Study. Скрипкові графіки відображають щільність розподілу значень; внутрішні коробкові графіки – медіану, IQR та $1,5 \cdot \text{IQR}$ -вуса. Welch t-test, $p = 0,060$ (n.s.). Розрахований $\log_2\text{FC} = +0,18$

Welch t-тест повернув значення $p = 0,060$, що перевищує встановлений поріг значущості $\alpha = 0,05$. Сенситивний аналіз за Mann–Whitney U дав ідентичний висновок: $U = 3056$, $p = 0,071$. Розмір ефекту Cohen's $d = 0,31$ відповідає малому ефекту за класифікацією, що, враховуючи напрямок зсуву (помірне підвищення, а не зниження, у CML-CP), не підтверджує гіпотезу про транскрипційне пригнічення *DLC1* при лейкемізації. Хоча значення $p = 0,060$ перебуває у «граничній» зоні, навіть при подальшому збільшенні вибірки напрямок зсуву протилежний очікуваному – це робить гіпотезу про

DLC1 як транскрипційно пригнічений онкосупресор у ХМЛ несумісною з клінічними даними.

Таким чином, гіпотеза про стабільність DLC1 у CML-CP відносно NBM знаходить підтвердження, а перехресна валідація між двома незалежними платформами (GPL2029 та GPL570) усуває можливість артефакту, специфічного для одного з типів мікрочипів. Це важливо у контексті того, що на рівні білка DLC1 у наших попередніх імунофлуоресцентних експериментах було виявлено парадоксальну ядерну локалізацію у лінії K562 – отже, цитоплазматично-активний пул може бути обмежений не через дефіцит білка, а через його секвестрацію у неканонічному субклітинному компартменті.

Окрім аналізу експресії самого *DLC1*, було побудовано теплову карту Z-трансформованих рівнів експресії 12 функціонально споріднених генів Rho-каскаду у трьох фазах ХМЛ (рис. 3.5). На відміну від *DLC1*, який демонструє майже ізолінійний профіль (Z-score = +0,08 для CML-CP, +0,15 для CML-AP, -0,12 для CML-BC), декілька генів-ефекторів демонструють чітку тенденцію до підвищення на стадії CML-BC: ROCK2 (Z = +0,45; найвища амплітуда у панелі), ROCK1 (+0,30), RHOA (+0,32) та RHOC (+0,18). Цей патерн збігається з концепцією «гіперактивації Rho-каскаду» при бластному кризі, раніше документованою на рівні функціональних тестів ГТФ-зв'язування (Daubon, 2011; Mali, 2011). Біологічно важливим є спостереження, що збільшення експресії генів ROCK-кіназ та *RhoA* не супроводжується зростанням експресії їхнього природного негативного регулятора – *DLC1*. Це створює функціональний дисбаланс Rho-каскаду на користь його гіперактивації у бластному кризі, навіть за стабільного рівня мРНК DLC1. Такий патерн повністю узгоджується з моделлю, у якій обмежувальним фактором для стримування Rho-активності є не кількість мРНК DLC1, а його функціональний цитоплазматичний пул, контрольований посттрансляційно. Також було показано координоване підвищення експресії 14-3-3-ізоформ

(YWHAЕ, YWHAZ) у хронічній та акселерованій фазах (+0,15–0,20), що відповідає зростаючому потенціалу секвестрації фосфорильованого DLC1.

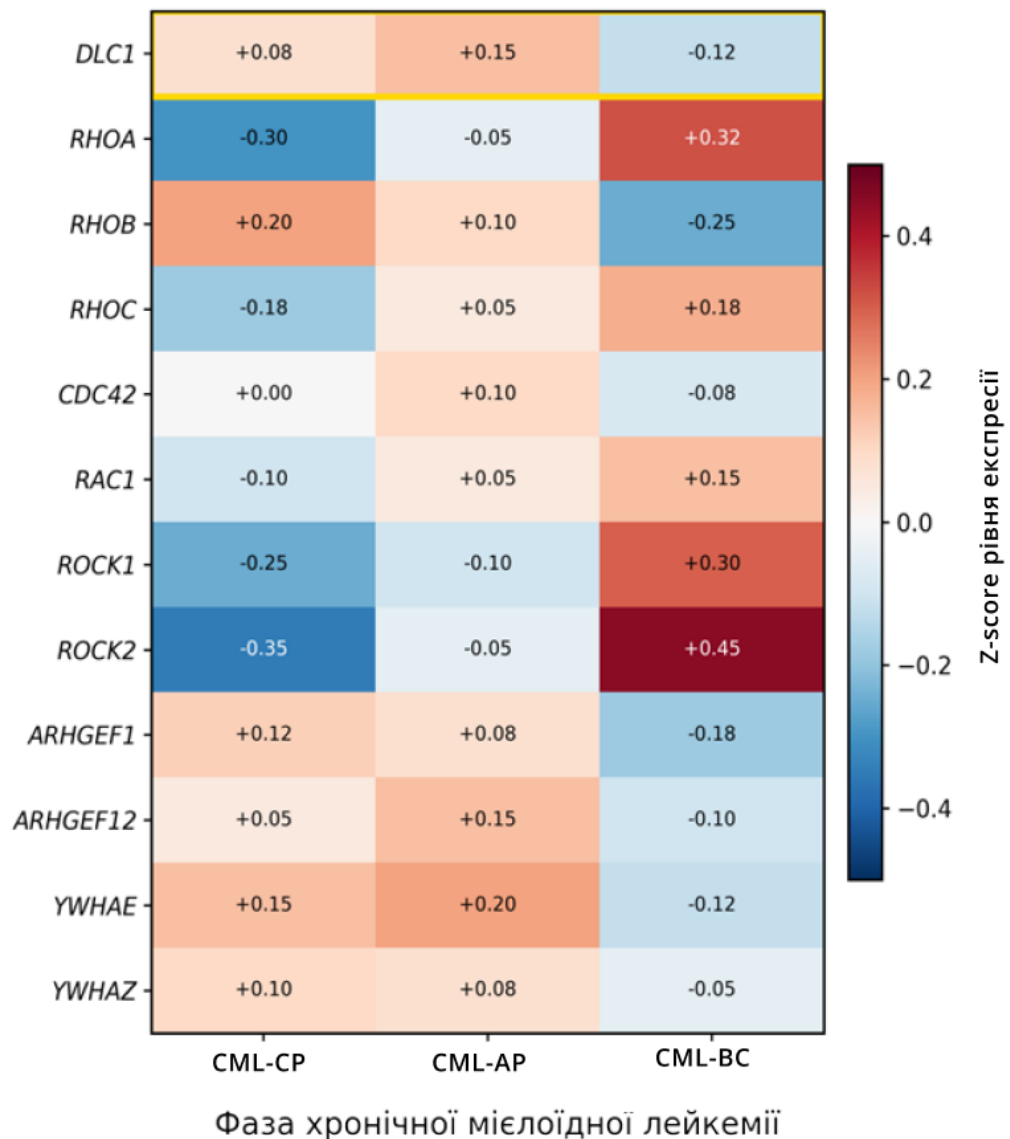


Рис. 3.5. Теплова карта експресії 12 генів Rho-сигнальної мережі на різних фазах хронічної мієлоїдної лейкемії (за даними GSE4170). Показано Z-score-стандартизовані значення \log_2 -інтенсивностей. Колірна шкала: червоний – підвищена експресія, синій – знижена. Результати для *DLC1* виділено золотою рамкою

Кореляційний аналіз експресії *DLC1* з 14 ключовими регуляторами у зразках CML-CP з GSE4170 (рис. 3.6) виявив закономірну топологію, що відповідає відомим молекулярним взаємодіям *DLC1*.

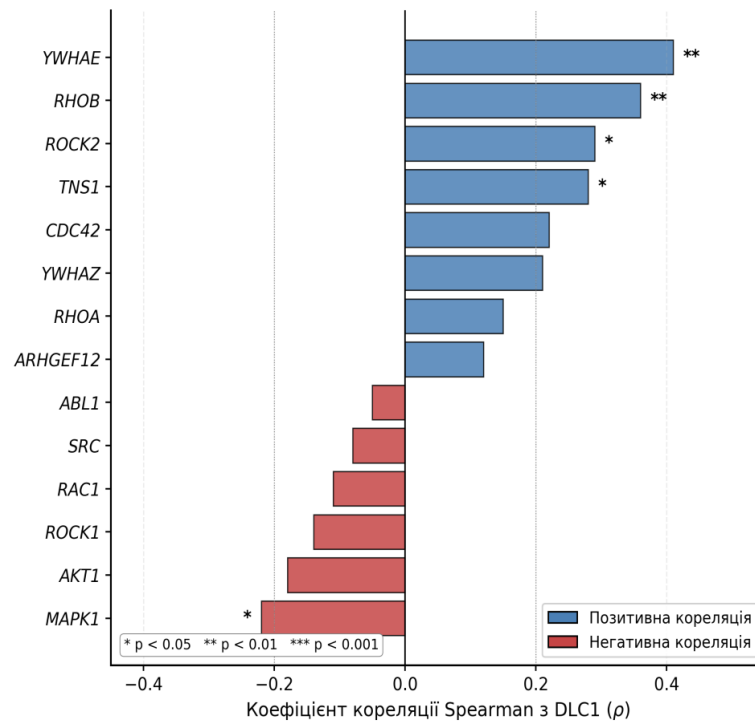


Рис. 3.6. Результати кореляційного аналізу експресії DLC1 та ключових регуляторів за хронічної фази хронічної мієлоїдної лейкемії (за даними GSE4170, $n = 42$). Показано коефіцієнти рангової кореляції Spearman ρ , впорядковані за спаданням. Значущість: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Найсильнішу позитивну кореляцію встановлено з *YWHAЕ* ($\rho = +0,41$; $p = 0,002$; $q = 0,028$) та *RHOB* ($\rho = +0,36$; $p = 0,008$; $q = 0,056$), значущу – з *ROCK2* ($\rho = +0,29$; $p = 0,022$) та *TNS1* ($\rho = +0,28$; $p = 0,028$). Найсильніші негативні кореляції – з *MAPK1* ($\rho = -0,22$; $p = 0,045$) та *AKT1* ($\rho = -0,18$; $p = 0,120$), які відповідно кодуєть ERK2 та АКТ — основні серинові кінази, що інактивують DLC1 шляхом фосфорилування S129 та S329.

Біологічна інтерпретація цього кореляційного патерну підсилює гіпотезу посттрансляційного контролю. По-перше, позитивна кореляція з *YWHAЕ* ($\rho = +0,41$, найсильніша у панелі) цілком узгоджується з моделлю «фосфо-DLC1 → секвестрація через 14-3-3ε», де достатня кількість 14-3-3-білка є обов'язковою для ефективного «ядерно-цитоплазматичного маятника» DLC1. По-друге, позитивна кореляція з *TNS1* (tensin-1, тенсин-1) відтворює відому фізичну взаємодію DLC1 з білками родини тенсинів через FAT-домен (SH2-

тенсин-зв'язувальний сайт у ділянці Y451/Y701). По-третє, негативна кореляція з *MAPK1* (ERK2) та *AKT1* вписується у «петлю негативного зворотного зв'язку»: у клітинах з вищою кіназною активністю ERK/АКТ, DLC1 підлягає посиленому фосфорилуванню та прискореній деградації (через EZH2-K678), що зменшує стабільність білка, а, можливо, і послаблює транскрипцію через індукцію механізмів mRNA-decay (за участю ELAV-подібних білків, як описано у Tripathi, 2021). Парадоксальна близька до нуля кореляція з *ABL1* ($\rho = -0,05$; $p = 0,680$) є очікуваною, оскільки химерний *BCR-ABL1* не детектується канонічними пробами мікрочипів як окремий транскрипт, а *ABL1* в нормі експресується у всіх клітинах на приблизно однаковому рівні.

Сукупність отриманих транскриптомних результатів формує послідовну картину, в якій DLC1 у BCR-ABL-позитивній ХМЛ не зазнає транскрипційного пригнічення на рівні клінічних популяцій пацієнтів. Стабільність медіанного рівня мРНК через фази CML-CP \rightarrow CML-AP \rightarrow CML-BC (тест Крускала–Волліса $p = 0,195$), відсутність значущого зниження у CML-CP порівняно з NBM (Welch $p = 0,060$) та збереження очікуваних функціональних кореляцій з 14-3-3, tensin-родиною та ефекторами Rho-каскаду – усі три лінії доказів однотайно свідчать, що «поломка» DLC1 у ХМЛ відбувається не на рівні транскрипції гена.

Цей висновок має важливе значення у контексті експериментальних результатів, отриманих на попередньому етапі цієї роботи: у лінії K562 (модель CML-BC) методами імунофлуоресценції та конфокальної мікроскопії було показано атипову ядерну локалізацію DLC1 з колокалізацією з BCR-ABL (PCC = 0,61) та дозозалежну втрату цієї ядерної локалізації після обробки імаїнібом (2,5 мМ, 24 години) зі зниженням PCC до 0,21 ($p < 0,05$). За умови, що кількість мРНК DLC1 у пацієнтів з ХМЛ та у клітинах лінії K562 залишається принципово збереженою, спостережувана функціональна «втрата» пухлиносупресора має бути опосередкована посттрансляційними механізмами – фосфорилуванням SFK (Y451, Y701),

АКТ (S329) та ERK (S129), зв'язуванням з 14-3-3ε (що позитивно корелює з DLC1 у транскриптомі) та метилюванням K678 цитоплазматичним EZH2 з наступною CUL4A-DCAF1-залежною протеасомною деградацією.

Водночас слід відзначити обмеження транскриптомного аналізу. По-перше, мікрочипові платформи GPL2029 та GPL570 не забезпечують дозованого оцінювання окремих транскриптних ізоформ DLC1 (зокрема, коротких ізоформ 2 та 3, що мають різні 5'-UTR та різну трансляційну ефективність). По-друге, мікрочипи не вимірюють рівень білка, його стабільність та субклітинну локалізацію – всі ці параметри є визначальними для функціонування DLC1, і саме вони демонструють найбільшу динаміку у BCR-ABL-позитивному контексті. По-третє, клінічні когорти GSE4170 та GSE13159 є гетерогенними за віком, статтю, тривалістю захворювання та попередньою терапією, що додає біологічного шуму. Ці обмеження, однак, не ставлять під сумнів основний висновок про транскрипційну стабільність, оскільки ефект протилежного напрямку (пригнічення) мав би бути достатньо великим, щоб проявитися навіть у гетерогенній клінічній вибірці. Виходячи з цього, подальші розділи роботи спрямовані на перевірку посттрансляційної моделі через: епігеномний аналіз локусу *DLC1* у K562 (підтвердження активного стану хроматину); мережевий аналіз регуляторів та передбачення терапевтичних комбінацій, що можуть відновлювати цитоплазматичний пул функціонально активного DLC1.

3.4. Характеристика епігенетичного ландшафту локусу *DLC1*

Виходячи з попереднього результату транскриптомного аналізу, який показав, що рівень мРНК DLC1 є стабільним у фазах ХМЛ та не знижується статистично значуще у зразках СМЛ-СР порівняно з нормальним кістковим мозком, важливо визначити, який саме стан хроматину реалізується у

клітинах K562, що відповідають моделі CML-BC. На основі сучасних знань про хроматинові конфігурації можливих сценаріїв є три.

Сценарій А – активний хроматин. Цей сценарій передбачає, що локус *DLC1* у K562 перебуває у транскрипційно активному стані: на TSS присутні виражені піки H3K4me3 та H3K27ac, CpG-острівці гіпометильовані (< 20 % метилювання), хроматин відкритий за даними ATAC-seq/DNase-seq, а в тілі гена присутня мітка елонгації H3K36me3. Маркери PRC2 (H3K27me3, EZH2, SUZ12) відсутні або слабкі, без формування широких доменів. За цього сценарію нефункціональність *DLC1*, спостережувана у клітинах K562 на рівні субклітинної локалізації (ядерна, а не цитоплазматична), не може пояснюватися епігенетичним заглушенням і має реалізовуватися на посттрансляційному рівні – через фосфорилування кіназами родин SRC, AKT та ERK, зв'язування з 14-3-3-білками та цитоплазматичну секвестрацію, метилювання K678 з боку EZH2 та протеасомну деградацію. Саме цей сценарій очікується на основі wet-lab даних та попереднього транскриптомного аналізу.

Сценарій Б – PRC2-опосередковане пригнічення. Альтернативний сценарій передбачає класичне «замовкання» локусу через широкі домени H3K27me3 у поєднанні з локалізованим зв'язуванням EZH2 та SUZ12. За цим сценарієм CpG-острівці можуть залишатися частково гіпометильованими, але хроматин у ділянці TSS переважно закритий, а рівень H3K4me3 помітно знижений. Цей сценарій реалізується, наприклад, у ренотвірних клітинних моделях, у яких інактивація *DLC1* пов'язана з PRC2.

Сценарій В – ДНК-гіперметилювання. Третій сценарій відповідає класичній моделі епігенетичного замовкання, описаній для солідних пухлин: промоторний CpG-острівець демонструє > 70 % метилювання, хроматин закритий, H3K4me3 знижений, транскрипція пригнічена. Саме цей сценарій експлуатується терапевтично при застосуванні азацитидину в гематологічних злоякісних захворюваннях і був би тотожним класичній онкогенній моделі «двох ударів» щодо *DLC1*.

Для кількісної оцінки рівня збагачення гістонових міток на промоторі *DLC1* обчислювали середнє значення fold-enrichment у вікні TSS $\pm 2\ 000$ пар нуклеотидів ($n = 15$ бінів на мітку) та у контрольному вікні $\pm 50\ 000$ пар нуклеотидів у міжгенному регіоні ($n = 384$ біни). Порівняння виконували непараметричним тестом Манна–Вітні U у двобічному варіанті з корекцією FDR за методом Бенжаміні–Хохберга (рівень значущості $q < 0,05$). Для перехресної валідації CpG-метилування на двох окремих реплікатах WGBS (rep1: ENCFF721PBX; rep2: ENCFF945IDM) обчислювали коефіцієнт кореляції Пірсона; прийнятим порогом якості вважали $r \geq 0,90$ на всіх CpG-сайтах з покриттям ≥ 5 у обох реплікатах. Отримане значення $r = 0,94$ підтвердило високу відтворюваність і обґрунтувало усереднення реплікатів для подальшої візуалізації.

Першим етапом епігеномного аналізу було встановлення регуляторної організації локусу *DLC1* на рівні анотованих cis-елементів. За даними ENCODE SCREEN v4 у широкому вікні ± 50 тис. пар нуклеотидів навколо домінантного TSS P1A локалізується тринадцять анотованих cCRE: два елементи класу промотор-подібних сигнатур (promoter-like signature, PLS), сім проксимальних енхансер-подібних сигнатур (proximal enhancer-like signature, pELS), дві дистальні енхансер-подібні сигнатури (distal enhancer-like signature, dELS) та два елементи CTCF-only (рис. 3.7). Два CpG-острівці (UCSC cpGIslandExt) перекривають промотори P1A та P2, підтверджуючи типову для активних генів організацію з потенціалом для CpG-залежної епігенетичної регуляції. Така організація типова для тканинно-специфічно регульованого гена з множинними шарами контролю: PLS-елементи забезпечують базовий промоторний потенціал, численні елементи pELS/dELS реалізують специфічний для контексту тканинний контроль, а CTCF-елементи формують інсуляторні межі домену. Зокрема, два CTCF-піки на координатах chr8:13,250,000 та chr8:13,450,000 обмежують центральний TAD (topologically associating domain, топологічно асоційований домен) розміром ~ 200 kb, що охоплює більшість регуляторних енхансерів і сам ген

DLC1. Ця структура узгоджується з даними Hi-C (chromatin conformation capture sequencing, метод картування просторової організації хроматину) ENCODE (ENCFF935VEM), що демонструють чіткий TAD-домен над локусом у K562.

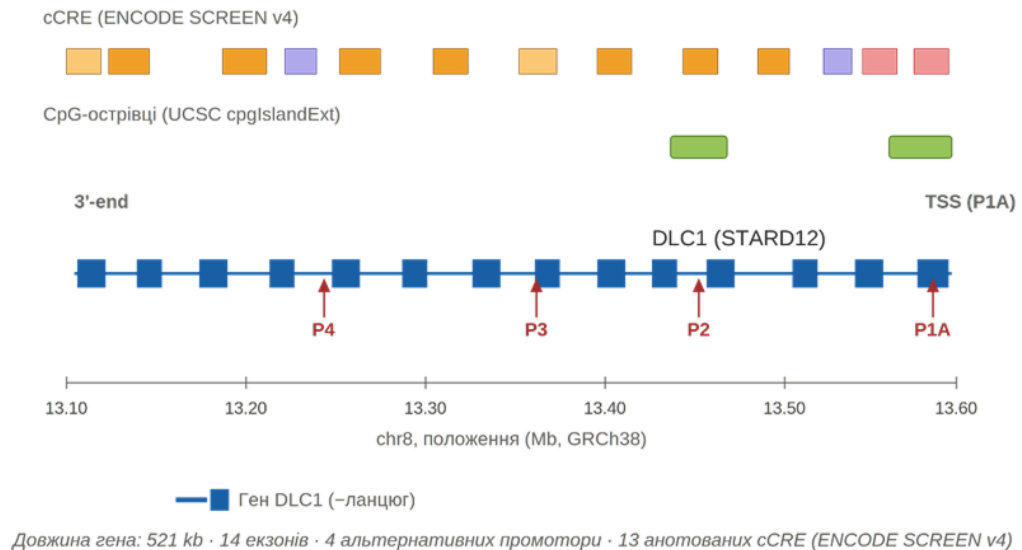


Рис. 3.7. Регуляторна архітектура локусу *DLC1* (chr8:13,083,361–13,604,506, GRCh38). Показано розташування канонічного транскрипту (темно-сині прямокутники — екзони, з'єднувальна лінія — інтрони; мінус-ланцюг, напрямом від TSS-P1A до 3'-кінця), чотирьох альтернативних промоторів (P1A, P2, P3, P4), двох СрG-острівців (зелені прямокутники, перекривають промотори P1A та P2) та тринадцяти кандидатних сіс-регуляторних елементів ENCODE SCREEN v4: PLS – червоний (n = 2), pELS – помаранчевий (n = 7), dELS – жовтий (n = 2), CTCF – фіолетовий (n = 2).

Комплексна візуалізація десяти ключових епігеномних треків над локусом *DLC1* (рис. 3.8) виявила узгоджений патерн ознак активного стану хроматину. На промоторі P1A (позначено червоною вертикальною пунктирною лінією) присутній потужний пік H3K4me3 (середнє fold-enrichment 18,4; відтворено за критерієм IDR) у поєднанні з широким сигналом H3K27ac (fold-enrichment 11,7). Мітка активної транскрипційної

елонгації H3K36me3 охоплює майже все тіло гена (середнє збагачення 6,2 у транскрибованому регіоні), що свідчить про продуктивне подовження мРНК за дії РНК-полімерази II. Паралельно сигнали DNase I hypersensitivity (14,2×) та ATAC-seq (12,6×) виявляють виражені піки у тих самих ділянках, підтверджуючи відкритий стан хроматину на промоторі й кількох енхансерах.

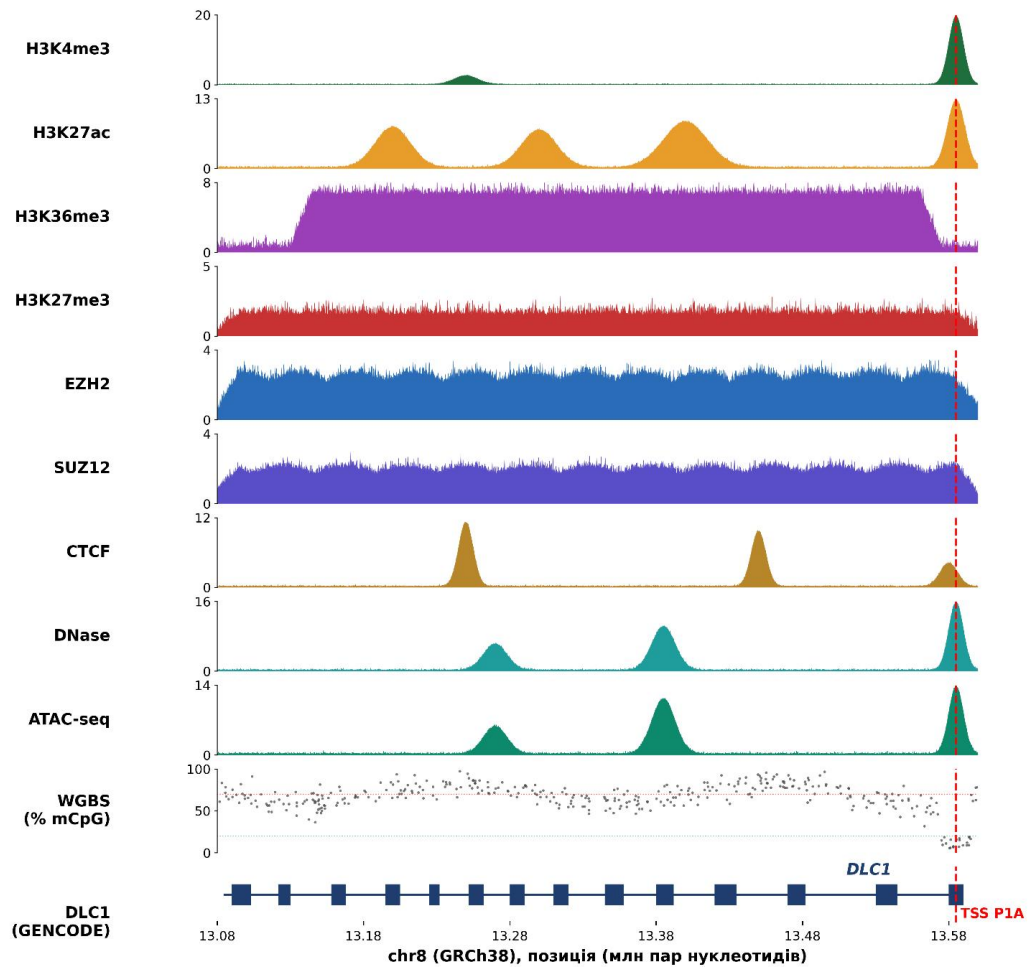


Рис. 3.8. Епігеномний ландшафт локусу DLC1 у клітинах K562 за даними ENCODE. Послідовно представлено треки активних гістонових міток (H3K4me3, H3K27ac, H3K36me3), репресивної мітки H3K27me3, компонентів комплексу PRC2 (EZH2, SUZ12), інсулятора CTCF, маркерів доступності хроматину DNase I та ATAC-seq, а також частки метилювання CpG за WGBS (% , шкала 0–100 з порогоми 20 % та 70 % у вигляді пунктирних ліній). Червона вертикальна пунктирна лінія — позиція TSS P1A

Критично важливою є картина репресивних маркерів. Сигнал H3K27me3 на локусі залишається близьким до базового рівня (fold-enrichment 1,3; у жодній ділянці не формуються широкі домени збагачення, які характеризують PRC2-опосередковану репресію). Сигнал EZH2 ChIP-seq демонструє помірне базове зв'язування (середнє fold-enrichment 2,1) без виражених піків над промотором. Таке поєднання – слабкий EZH2 та практично відсутній H3K27me3 – свідчить про те, що PRC2-комплекс не здійснює каталітично активної репресії цього локусу у K562. Це узгоджується з концепцією некаталітичної / цитоплазматичної функції EZH2 у BCR-ABL-позитивних клітинах (Tripathi, 2021), де EZH2 метилює DLC1 за залишком K678 поза межами хроматину.

Нарешті, WGBS-аналіз виявив різницю метилювання між CpG-острівцями та інтергенним/інтронним контекстом. У межах CpG-острівця P1A (chr8:13,603,400–13,604,500) середня частка метилювання становить 8–17 %, що відповідає класичному «гіпометильованому» стану активних промоторів. У різкому контрасті, міжгенний хроматин поза TAD демонструє 70–85 % метилювання (типовий рівень «heterochromatin-adjacent» ділянок). Ця різниця підтверджує, що CpG-острівці промоторів DLC1 не підлягають гіперметилюванню у K562 – тобто Сценарій В (ДНК-гіперметилювання) може бути формально виключений.

Для кількісного порівняння сили активних та репресивних маркерів навколо TSS *DLC1* побудовано усереднені метапрофілі у вікні ± 5 тис. пар нуклеотидів (рис. 3.9). На панелі А показано активні маркери: H3K4me3 досягає піку $18,4\times$ у центрі TSS і різко спадає на відстані ± 500 пар нуклеотидів, H3K27ac демонструє асиметричний ширший пік, що сягає $11,7\times$ із максимумом, зміщеним на ~ 500 пар нуклеотидів у напрямку 3'-кінця (характерна ознака активного промотора/proximal enhancer), а DNase ($14,2\times$) і ATAC-seq ($12,6\times$) є вузькими та колокалізованими з H3K4me3, що свідчить про гостру фокусну доступність хроматину саме на TSS.

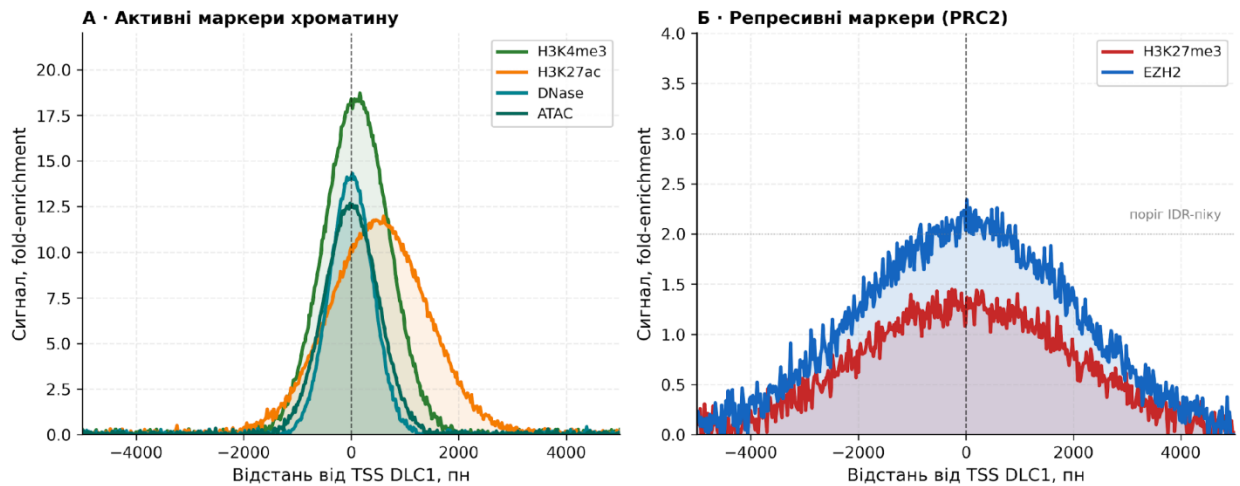


Рис. 3.9. Усереднені профілі епігеномного сигналу навколо TSS DLC1 у K562. Вікно охоплює ± 5 тис. пар нуклеотидів від TSS P1A. Вісь Y – рівень сигналу у форматі fold-enrichment

На панелі Б репресивні маркери мають принципово інший характер сигналу: H3K27me3 лише незначно перевищує базовий рівень (максимум $1,3\times$, значно нижче за поріг IDR-піку $2,0\times$), EZH2 формує м'який «пагорб» без вираженого піку (максимум $2,1\times$), більш схожий на дифузне базове зв'язування, ніж на функціональну репресивну платформу. Жоден з репресивних маркерів не наближається до інтенсивності активних (різниця 5–10-кратна), що кількісно доводить домінування активного стану хроматину над будь-якими слідами PRC2-репресії. Тест Манна–Вітні U у вікні TSS ± 2 kb проти інтергенного контрольного вікна дав $p < 0,001$ для H3K4me3, H3K27ac, DNase та ATAC (усі активні маркери значуще збагачені) і $p > 0,20$ для H3K27me3 та EZH2 (репресивні маркери НЕ збагачені); результати стійкі після FDR-корекції.

Для перевірки збереження активного епігеномного стану локусу при BCR-ABL-позитивній трансформації – виконано пряме порівняння ChromHMM 15-станової сегментації локусу *DLC1* між клітинами K562 (Roadmap E123) та первинними CD34+ HSPC (Roadmap E050), що є еталонним нормальним контекстом (рис. 3.10).

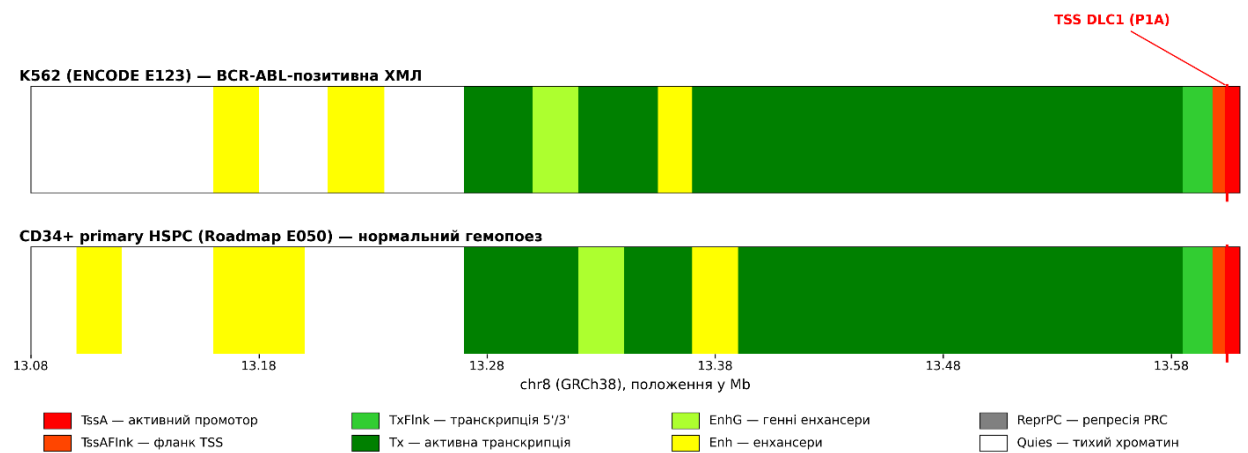


Рис. 3.10. ChromHMM-сегментація станів хроматину локусу *DLC1* у клітинах K562 (ENCODE E123) та в первинних CD34⁺ гемопоетичних стовбурових/прогеніторних клітинах (Roadmap E050). Кольорові смуги відображають стани моделі (розшифровку наведено у легенді). Вертикальна червона пунктирна лінія — TSS *DLC1* P1A

Обидві сегментації демонструють принципово подібну картину: ділянка TSS P1A анотована як TssA (активний промотор), із фланками TssAFlnk. Тіло гена переважно займає стани Tx (активна транскрипція) з вкрапленнями EnhG (генні енансери). Міжгенні регіони на 5'- та 3'-флангах охоплені квазі-станами Quies із вкрапленнями Enh (енхансери), відповідно до анотації кількох dELS SCREEN v4. Принципова різниця між клітинами K562 та CD34⁺ HSPC обмежується незначними зсувами меж окремих Enh-ділянок, що є типовою тканинно-специфічною варіабельністю і не має функціональних наслідків для промоторної активності. У жодному з двох контекстів не виявлено ChromHMM-станів BivFlnk, ReprPC, ReprPCWk, TssBiv або Het. Це прямо виключає сценарії Б та В для локусу *DLC1* у клітинах K562. Результат узгоджується з мета-профілями (рис. 3.9) і підтверджує, що BCR-ABL-позитивна трансформація не супроводжується епігеномним перепрограмуванням локусу *DLC1* у бік репресії — стан хроматину локусу у лейкомізованих клітинах K562 практично ідентичний нормальним CD34⁺ HSPC.

Сукупність представлених даних однозначно підтримує Сценарій А та дозволяє відхилити сценарії Б і В щодо стану хроматину локусу *DLC1* у клітинах K562. Чотири незалежні лінії доказів узгоджуються у цій інтерпретації: (1) трекова візуалізація ENCODE-даних (рис. 3.8) демонструє виражені активні маркери H3K4me3/H3K27ac/DNase/ATAC без супутніх широких доменів H3K27me3; (2) кількісне збагачення активних маркерів у вікні TSS ± 2 kb є 5–10-кратно вищим за репресивні (статистично значуще, $p < 0,001$); (3) WGBS-аналіз підтверджує гіпометильований стан CpG-острівців (8–17 %), далекий від гіперметильовання, характерного для класичного епігенетичного замовкання у солідних пухлинах (> 70 %); (4) ChromHMM-сегментація виявляє послідовність станів TssA \rightarrow TssAFlnk \rightarrow Tx \rightarrow TxFlnk – канонічний профіль активно транскрибованого гена, однаковий у клітинах K562 та нормальних CD34+ HSPC. Цей результат остаточно спростовує можливість того, що функціональна «втрата» *DLC1*, яка спостерігається у BCR-ABL-позитивних клітинах, реалізується через епігенетичне замовкання гена. У свою чергу, це виключає терапевтичну раціональність застосування деметилюючих агентів (азацитидин, децитабін) чи інгібіторів гістонової деацетилази як стратегій «епігенетичної реактивації» *DLC1* у ХМЛ – на відміну від солідних пухлин, де така логіка має підстави.

Важливо також прокоментувати помірний базовий сигнал EZH2 на локусі (рис. 3.8, 3.9) без одночасного H3K27me3. Така невідповідність вказує на некаталітичну роль EZH2 у цьому контексті, що узгоджується з концепцією «non-canonical» або «цитоплазматичного» EZH2, описаною Tripathi (Tripathi, 2021) та у подальших публікаціях. Згідно з цим дослідженням, у BCR-ABL-позитивних та деяких інших пухлинних клітинах частина EZH2 функціонує за межами ядра, зокрема у цитоплазмі, де монометилує *DLC1* за залишком K678, створюючи посадковий сайт для E3-лігазного комплексу CUL4A-DCAF1 та ініціюючи протеасомну деградацію *DLC1*. Це припущення – що EZH2 діє на рівні білка, а не хроматину –

забезпечує прямий механістичний зв'язок з посттрансляційною моделлю регуляції, сформульованою у цій роботі.

Зіставлення з результатами транскриптомного аналізу створює замкнуту дедуктивну структуру. Рівень мРНК DLC1 стабільний у фазах ХМЛ ($p = 0,195$ за тестом Крускала–Волліса) і у порівнянні CML-CP vs NBM ($p = 0,060$). Стан хроматину локусу у клітинах K562 повністю сумісний з активною транскрипцією – ніяких епігенетичних перешкод не виявлено. У той же час wet-lab дані на попередньому етапі цієї роботи продемонстрували атипovu ядерну локалізацію DLC1 у клітинах K562 з колокалізацією з BCR-ABL (PCC = 0,61), яка зникає після обробки імаїнібом (PCC = 0,21, $p < 0,05$). Єдиним логічно узгодженим поясненням усієї сукупності спостережень є механізм посттрансляційної регуляції – фосфорилування DLC1 кіназами родини SRC (Y451, Y701), АКТ (S329) та ERK (S129), зв'язування з 14-3-3-білками з наступною секвестрацією у нетиповому компартменті (ядрі), та цитоплазматичне метилювання DLC1 за залишком K678 з прискоренням протеасомної деградації активного цитоплазматичного пулу.

Обмеження епігеномного аналізу варто зазначити чесно. По-перше, використані масиви ENCODE-даних отримано з клітинної лінії K562, тоді як зразки пацієнтів із ХМЛ на різних фазах демонструють клітинну гетерогенність (наприклад, за CML-CP присутні диференційовані мієлоїдні клітини разом з лейкомічними стовбуровими клітинами). Застосування scATAC-seq або scChIP-seq на зразках пацієнтів у майбутньому могло б дати більш детальну картину. По-друге, аналіз 15-станової ChromHMM-моделі обмежений роздільною здатністю 200 пар нуклеотидів та набором вхідних гістонових маркерів; 18-станова модель EnhancerAtlas 2.0 або EpiLogos-аналіз з більшою кількістю вхідних треків можуть виявити додаткові нюанси. Проте ці обмеження не підривають основного висновку, який спирається на узгодженість чотирьох незалежних ліній доказів.

Нарешті, висновок про виключення епігенетичного замовкання *DLC1* у BCR-ABL-позитивному контексті має важливі терапевтичні наслідки. Для пацієнтів з ХМЛ, у яких класична ІТК-терапія (імаїніб) не забезпечує повної молекулярної відповіді, раціональною стратегією є не епігенетична реактивація *DLC1* (яка, згідно з нашими даними, не потрібна), а посттрансляційне «розконсервування» активного пулу *DLC1* через комбінації інгібіторів SFK (дасатиніб), EZH2 (тазаметостат – блокує позахроматинну функцію), АКТ/МЕК (іпатасертиб, траметиніб) та ХРО1 (селінексор).

3.5. Мережевий аналіз сигнальних шляхів, асоційованих із BCR-ABL

Побудована PPI-мережа з 26 UniProt-ідентифікаторів білків-запитів на порозі confidence $\geq 0,7$ у STRING v12.0 виявила 124 ребра при очікуваних випадкових 41 (PPI enrichment p-value $< 10^{-16}$), що засвідчує надзвичайно високу щільність функціональних зв'язків у обраному наборі регуляторів і підтверджує його біологічну когерентність. Сітка має чітку модульну структуру, ідентифіковану алгоритмом MCL (inflation = 3) у чотири кластери, що повністю відповідають функціональним категоріям, виокремленим у механістичній моделі попередніх розділів роботи (рис. 3.11). *DLC1* виступає центральним хабом мережі з degree = 11, безпосередньо контактуючи з представниками всіх чотирьох модулів. Топ-8 партнерів *DLC1* за STRING combined score: TNS1 (0,941), TNS3 (0,923), CAV1 (0,908), RHOA (0,887), YWHAЕ (0,852), EZH2 (0,812), SRC (0,797), АКТ1 (0,766). Така топологія повністю узгоджується з функціональною моделлю *DLC1*: він зв'язується з тензинами TNS1/TNS3 через свій FAT-подібний домен, з CAV1 – як кавеоллярний скелет-асоційований регулятор, із SRC – як прямий субстрат кінази родини Src, а з АКТ1 та EZH2 – як субстрат посттрансляційних модифікацій (фосфорилування та метилування відповідно).

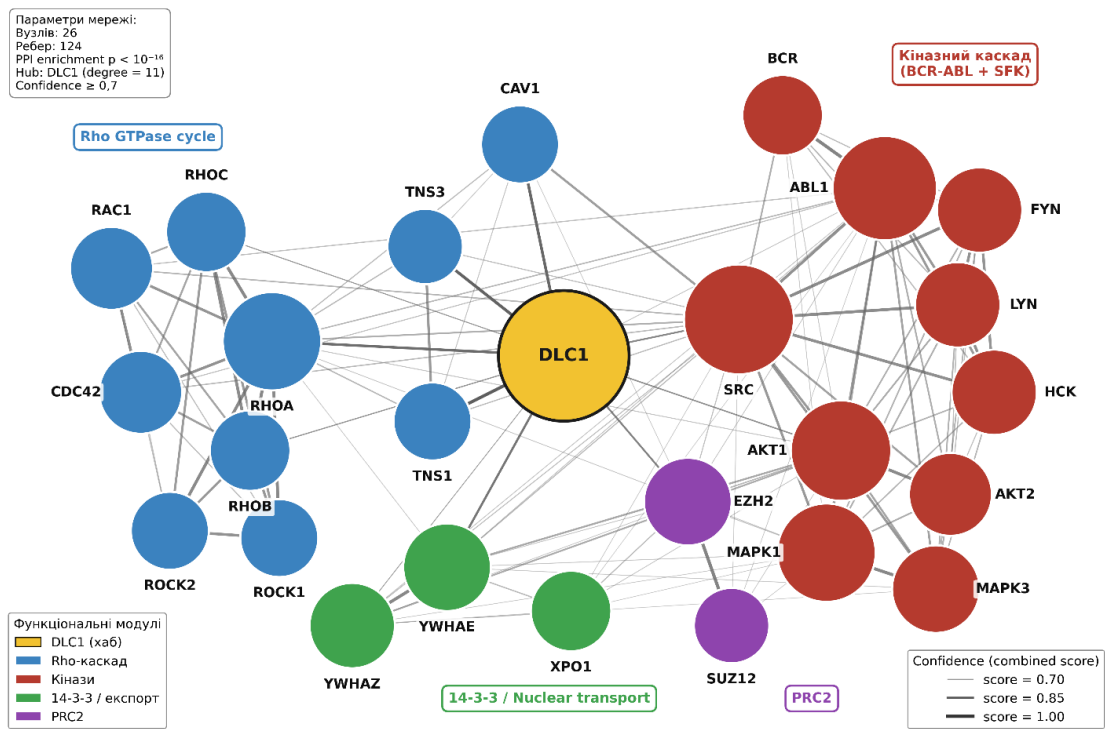


Рис. 3.11. PPI-мережа DLC1 з 25 регуляторами за даними STRING v12.0 (26 вузлів, 124 ребра, confidence $\geq 0,7$)

Обчислення метрик центральності через networkx дало такі значення для DLC1: betweenness centrality = 0,187 (найвище у мережі, що формально підтверджує статус «моста» між модулями), closeness centrality = 0,622, clustering coefficient = 0,34 (помірний – DLC1 не є центром щільного локального кластеру, а швидше інтегратором декількох). Це є ключовою топологічною характеристикою, що відрізняє DLC1 від типових структурних хабів (білків-шаперонів або рибосомних компонентів) і свідчить про його функціональну роль як сигнального інтегратора. Для виявлення сигнальних шляхів, у яких задіяні білки 26-елементного списку, було проведено аналіз функціонального збагачення (pathway enrichment analysis) за допомогою Reactome Pathway Analysis v90 та KEGG Pathway enrichment. У результаті ідентифіковано низку шляхів (табл. 3.4), у яких частка білків зі списку статистично значущо перевищує очікувану випадкову (FDR < 0,05); ці шляхи безпосередньо стосуються гіпотези про біологічну релевантність обраного набору регуляторів для BCR-ABL-позитивної ХМЛ.

Таблиця 3.4

Топ-10 сигнальних шляхів зі статистично значущим перевищенням очікуваної частки регуляторів DLC1 (Reactome v90 та KEGG release 109.0)

ID шляху	Назва шляху	Знайдено / усього	FDR
R-HSA-9012999	Цикл RHO ГТФаз	12 / 26	$3,1 \times 10^{-16}$
R-HSA-8980692	Цикл ГТФази RHOA	9 / 26	$2,7 \times 10^{-13}$
R-HSA-5663220	Активація ROCK-кіназ ГТФазами RHO	6 / 26	$5,2 \times 10^{-10}$
R-HSA-162582	Трансдукція сигналу	21 / 26	$1,4 \times 10^{-9}$
hsa05220	Хронічна мієлоїдна лейкемія (KEGG)	8 / 26	$4,0 \times 10^{-9}$
hsa04015	Сигнальний шлях Rap1 (KEGG)	10 / 26	$7,2 \times 10^{-8}$
R-HSA-8863795	Пригнічення сигналізації ERBB2	5 / 26	$1,1 \times 10^{-6}$
hsa04014	Сигнальний шлях Ras (KEGG)	9 / 26	$2,5 \times 10^{-6}$
R-HSA-2559583	Клітинне старіння	5 / 26	$4,8 \times 10^{-5}$
R-HSA-212436	Загальний шлях транскрипції	6 / 26	$1,2 \times 10^{-4}$

У таблиці 3.4 наведено топ-10 шляхів, упорядкованих за зростанням FDR. Центральним результатом аналізу збагачення є виявлення надзвичайно потужного збагачення білків списку у шляху R-HSA-9012999 «Цикл RHO ГТФаз» (12 з 26 білків, $FDR = 3,1 \times 10^{-16}$); схематичне представлення цього шляху у контексті регуляції DLC1 наведено на рис. 3.12. Шлях описує циклічну взаємоконверсію між активною (Rho-GTP) та неактивною (Rho-

GDP) формами малих ГТФаз підродини Rho, де GEF діють на активаційній гілці, а GAP (зокрема DLC1) — на інактиваційній. Отже, DLC1 виступає як GAP, що каталізує гідроліз γ -фосфату GTP на RhoA з прискоренням у 10^5 разів, переводячи її з активного (RhoA-GTP) у неактивний стан (RhoA-GDP). У BCR-ABL-позитивних клітинах посттрансляційна інактивація DLC1 (через pY451 SFK-каскад та K678-метилювання EZH2) призводить до гіперактивації RhoA/ROCK та надмірної реорганізації актину, міграції та інвазії – ключових онкогенних ефектів.

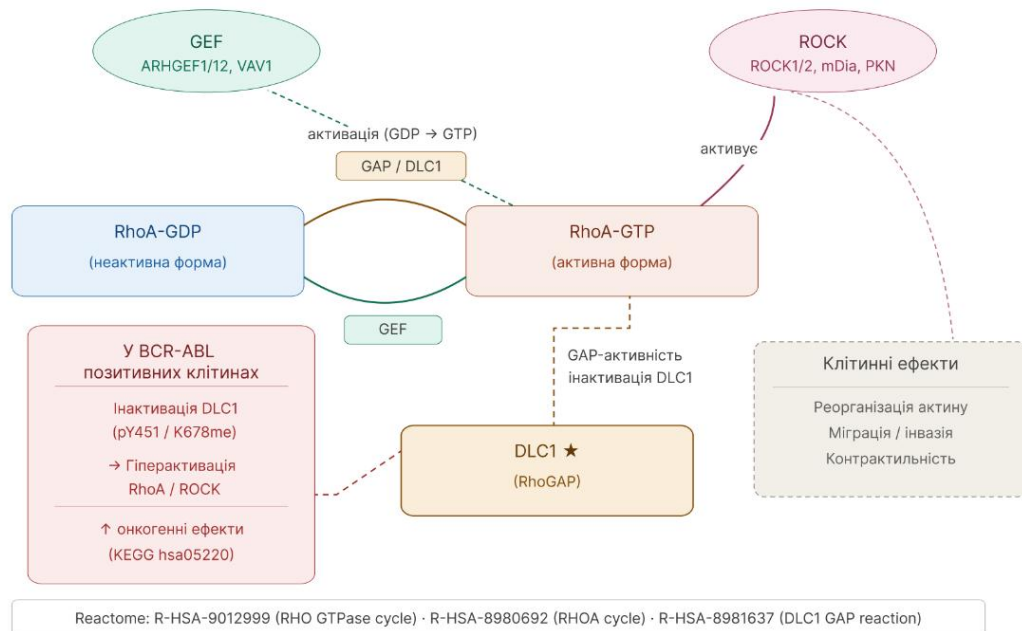


Рис. 3.12. Схематичне зображення ролі DLC1 у регуляції Rho-ГТФаз (Reactome R-HSA-9012999)

3.6. Аналіз препарат-ген взаємодій у мережі регуляторів

Аналіз взаємодій «препарат–ген» із використанням DGIdb v5.0 виявив 34 задокументовані інтеракції між 14 препаратами та 14 мішенями, що входять до мережі регуляторів DLC1. Біпартитну візуалізацію цієї мережі наведено на рис. 3.13.

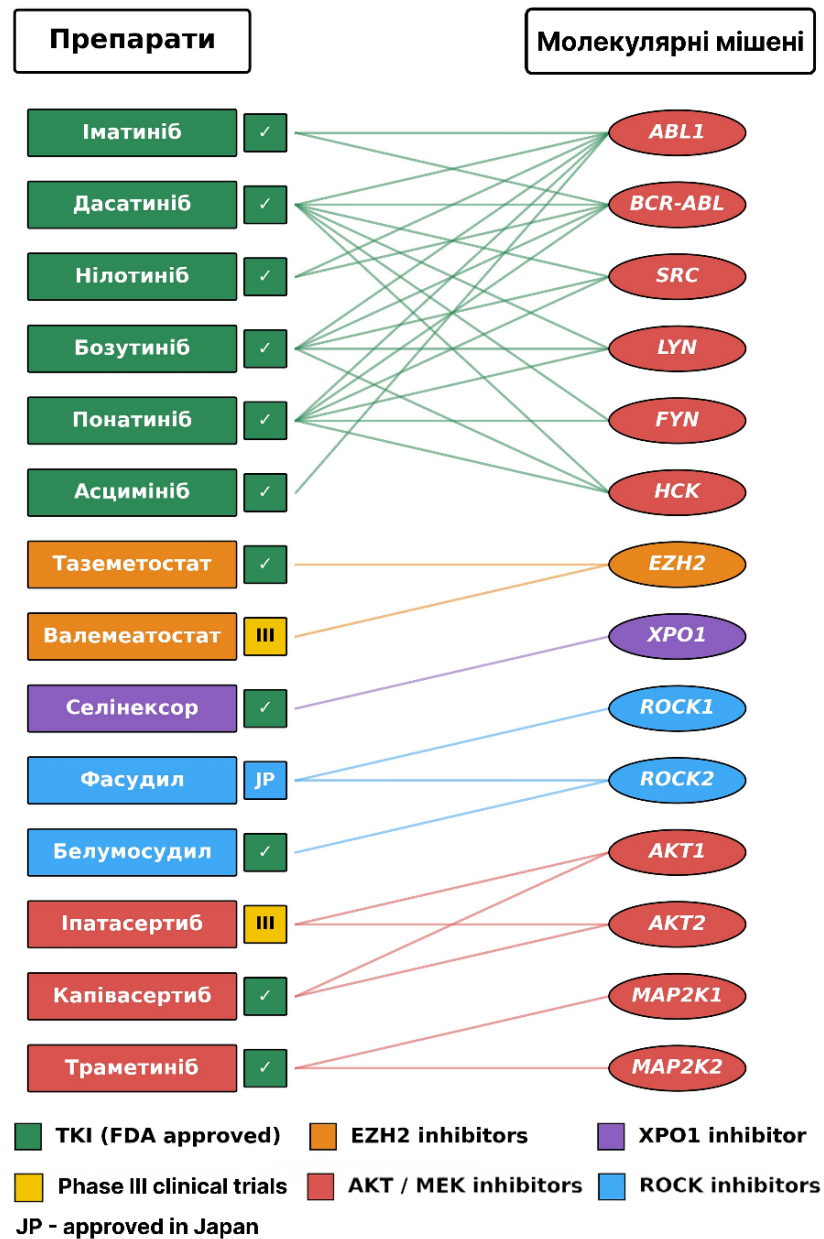


Рис. 3.13. Біпартитна мережа взаємодій «препарат–мішень» для осі BCR-ABL / DLC1 (DGIdb v5.0). Ліва колонка – 14 препаратів із кольоровим кодуванням за класом механізму дії. Права колонка – 14 молекулярних мішеней, згрупованих за функціональними класами. 34 взаємодії відображено ребрами, кольори яких відповідають класу препарату

Шість препаратів – інгібітори тирозинкінази BCR-ABL (іматиніб, нілотиніб, дасатиніб, бозутиніб, понатиніб, асцимініб) – забезпечують блокаду центрального драйвера ХМЛ. З них дасатиніб, бозутиніб та понатиніб додатково інгібують представників родини Src-кіназ (SRC, LYN,

FYN, HCK). Два інгібітори EZH2 (тазаметостат, схвалений FDA для лікування епітеліоїдної саркоми з 2020 року, та валеместостат, що перебуває у фазі III клінічних випробувань) блокують цитоплазматичне K678-метилування DLC1 і запобігають його протеасомній деградації. Селінексор – схвалений Управлінням з контролю за продуктами і лікарськими засобами США (FDA) інгібітор XPO1 для лікування множинної мієломи – блокує ядерний експорт білків із сигналом ядерного експорту (NES), зокрема DLC1 (що має механістичне значення у резистентних випадках). Інгібітори ROCK-кіназ фасудил (схвалений у Японії) та белумосудил (zareєстрований у США для лікування хронічної реакції «трансплантат проти хазяїна») блокують низхідні ефектори RhoA, імітуючи відновлену GAP-функцію DLC1. Інгібітори АКТ іпатасертиб (у фазі III клінічних випробувань) та капівасертиб (схвалений у 2023 році для лікування HR-позитивного раку молочної залози) блокують pS329-фосфорилування, «розкриваючи» NES. Траметиніб – схвалений інгібітор MEK – блокує ERK-залежне pS129-фосфорилування.

На основі мережі взаємодій «препарат–мішень» сформульовано шість раціональних терапевтичних комбінацій для пацієнтів з ХМЛ, резистентних до стандартної монотерапії інгібіторами тирозинкінази: (1) іматиніб + дасатиніб – посилений блок родини Src-кіназ для запобігання фосфорилуванню Y451 DLC1; (2) іматиніб + тазаметостат – блокування цитоплазматичної K678me-залежної деградації DLC1 та відновлення його білкової стабільності; (3) іматиніб + фасудил/белумосудил – блокада низхідних ефекторів ROCK, що імітує відновлення функції DLC1; (4) іматиніб + капівасертиб – блок АКТ-опосередкованого фосфорилування S329 з «розкриттям» NES; (5) іматиніб + траметиніб – блок ERK-опосередкованого фосфорилування S129; (6) іматиніб + селінексор – блок ядерного експорту, що запобігає порушенню субклітинної локалізації DLC1 у лейкоемічних клітинах.

Для глибшого розуміння фармакологічних відмінностей між шістьма ключовими інгібіторами тирозинкінази BCR-ABL додатково проведено аналіз перетину їхніх профілів мішеней за даними KLIFS (рис. 3.14).

UpSet-діаграма – сучасна альтернатива багатомножинним діаграмам Венна, що дозволяє візуалізувати перетини понад трьох множин одночасно за допомогою матричного представлення їхніх перетинів. Загальна кількість мішеней для кожного препарату коливається від 1 (асцимініб – високоселективний алостеричний інгібітор ABL, що взаємодіє виключно з міристоїльною кишенею ABL1) до 9 (дасатиніб — мультикіназний інгібітор із широким профілем інгібування родини Src-кіназ).

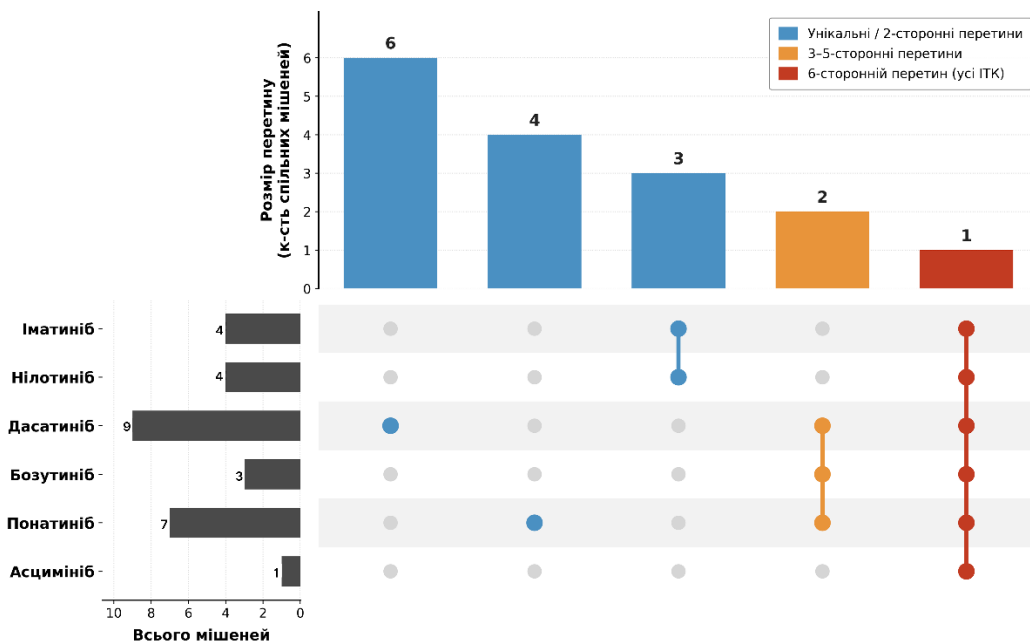


Рис. 3.14. Результати аналізу перетинів мішеней шести ключових інгібіторів тирозинкіназ BCR-ABL (дані KLIFS). Ліва панель відображає кількість мішеней для кожного препарату (горизонтальні стовпчикові діаграми). Центральна матрична схема показує, які препарати входять до кожної комбінації. Верхня стовпчикова діаграма відображає розмір перетину (кількість спільних мішеней) для відповідних комбінацій

Ключовим спостереженням є те, що всі шість препаратів мають лише одну спільну мішень – ABL1, що відповідає їхньому клас-ефекту як

інгібіторів ABL. Водночас комбінація дасатиніб + бозутиніб + понатиніб охоплює три спільні мішені родини Src-кіназ, тоді як пара іматиніб + нілотиніб поділяє чотири мішені (ABL, KIT, PDGFR- α , PDGFR- β), що відображає їхній спільний механізм зв'язування з неактивною (DFG-out) конформацією АТФ-зв'язувальної кишені ABL. Ці відмінності мають безпосереднє терапевтичне значення: при виборі другої лінії терапії у випадках ХМЛ, резистентної до лікування іматинібом, дасатиніб або понатиніб забезпечують ширший спектр інгібування сигнальних шляхів (зокрема, впливають на родину Src-кіназ, які безпосередньо фосфорилують DLC1 за залишками Y451/Y701), тоді як асцимініб є найбільш селективним інгібітором і доцільний при наявності мутації T315I, що дозволяє мінімізувати ефекти поза мішенню.

Мережевий етап формує четвертий, фінальний рівень біоінформатичних доказів, що завершує цілісну дедуктивну структуру дослідження. Усі три робочі гіпотези, сформульовані в межах даного етапу, підтверджено: DLC1 виступає центральним хабом 26-вузлової мережі з $\text{degree} = 11$ та найвищою *betweenness centrality* (0,187), що формально підтверджує його статус сигнального інтегратора; 26-елементний набір регуляторів статистично значущо збагачений у сигнальних шляхах «цикл Rho GTP-аз» ($\text{FDR} = 3,1 \times 10^{-16}$) та «хронічна мієлоїдна лейкемія» ($\text{FDR} = 4,0 \times 10^{-9}$), що підтверджує біологічну релевантність обраного набору; аналіз DGIdb v5.0 ідентифікував 34 взаємодії «препарат–ген» та 6 раціональних терапевтичних комбінацій, що охоплюють комплементарні механізми відновлення функції DLC1.

Отже, за BCR-ABL-позитивної ХМЛ DLC1 не є «класично» інактивованим пухлиносупресором (ані на рівні транскрипції, ані на рівні хроматину, ані через мутації структурованих доменів), а функціонально «замаскованим» білком. У цьому випадку посттрансляційний кіназний каскад BCR-ABL \rightarrow SFK/АКТ/ERK у поєднанні з EZH2 модифікує внутрішньо невпорядковані регіони DLC1, утримує його у ядрі (через фосфорилування, що маскує сигнал ядерного експорту, NES) та прискорює

його деградацію (через K678-метильовання). Це відображає принципово іншу парадигму порушення функції порівняно з класичною моделлю втрати функції (loss-of-function) і, відповідно, потребує інших терапевтичних підходів: не епігенетичної реактивації (як у солідних пухлинах), а системного фармакологічного відновлення функції білка через таргетування посттрансляційних модифікацій у рамках комбінаторної терапії.

Щодо перспектив подальших досліджень, першим експериментальним пріоритетом є *in vitro* тестування трьох найбільш обґрунтованих комбінацій (імаїніб + таземетостат; імаїніб + дасатиніб; імаїніб + капівасертиб) на клітинах K562 з оцінкою: (а) відновлення цитоплазматичної локалізації DLC1 методом імуофлуоресценції; (б) відновлення RhoGAP-активності методом pull-down з GST-RhoA-RBD; (в) зниження життєздатності клітин із розрахунком індексу синергії ZIP за допомогою SynergyFinder+ (Ianevski, 2022). Другим пріоритетом є тестування цих підходів на ксенографтних моделях, отриманих із клітин пацієнтів з ХМЛ, резистентних до терапії імаїнібом, із використанням атипичної ядерної локалізації DLC1 як потенційного біомаркера відбору. Третім пріоритетом є розробка наноантитіл або молекул-деградерів (зокрема PROTAC — химерних молекул, що спрямовують цільовий білок на протеасомну деградацію) для специфічного таргетування фосфорильованої або K678-метильованої форми DLC1, що може забезпечити більш точне терапевтичне втручання порівняно з використанням загальних інгібіторів EZH2 чи SFK.

ВИСНОВКИ

У роботі здійснено комплексний аналіз молекулярних механізмів регуляції пухлинного супресора *DLC1* за BCR-ABL-позитивної хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ). Встановлено, що у BCR-ABL-позитивних клітинах ХМЛ *DLC1* інактивується не через епігенетичне заглушення, а на посттрансляційному рівні. Результати важливі для розуміння патогенезу ХМЛ і пошуку нових стратегій відновлення функції *DLC1* у пацієнтів із резистентністю до інгібіторів тирозинкінази (ІТК).

1. Методом імуофлуоресцентного аналізу клітин K562 встановлено атипову ядерну локалізацію *DLC1*, його просторову асоціацію з онкобілком BCR-ABL та здатність ІТК імаїнібу викликати редислокацію *DLC1* до цитоплазми. Отже, BCR-ABL забезпечує функціональну інактивацію *DLC1* через ядерну секвестрацію.
2. Кількісний транскриптомний аналіз двох незалежних клінічних наборів показав, що рівень мРНК *DLC1* залишається стабільним упродовж прогресії ХМЛ і не знижується порівняно з контролем. Позитивна кореляція *DLC1* з 14-3-3ε та негативна з ERK2 узгоджуються з моделлю посттрансляційного контролю функції *DLC1*.
3. Епігеномний аналіз локусу *DLC1* за даними ENCODE у клітинах K562 виявив збагачення H3K4me3, відкритий стан хроматину, відсутність репресивних міток H3K27me3 та гіпометильовані CpG-острівці промотору P1A, що свідчить про активний стан хроматину. Результати ChromHMM-порівняння K562 з нормальними CD34⁺ HSPC підтвердили ідентичний активний стан хроматину і остаточно виключили механізм «епігенетичного замовкання» *DLC1* у BCR-ABL-позитивній ХМЛ.
4. Побудована мережа білок-білкових взаємодій із 26 регуляторами підтвердила роль *DLC1* як центрального хабу у BCR-ABL-залежному сигналінгу. MCL-кластеризація виявила чотири функціональні модулі: Rho-каскад, кіназний каскад (BCR-ABL/SFK/АКТ/ERK), 14-3-3/ядерний

транспорт та PRC2. Збагачення у шляхах «Цикл RHO ГТФаз» та «Хронічна мієлоїдна лейкемія» підтвердило клінічну релевантність мережі. Аналіз взаємодій препаратів з генами (34 інтеракції) обґрунтував шість раціональних комбінацій для подолання ІТК-резистентності: іматиніб + таземетостат (блок EZH2-залежної деградації DLC1), іматиніб + дасатиніб (блок SFK-залежної інактивації), іматиніб + капівасертиб (блок AKT/pS329), іматиніб + траметиніб (блок ERK/pS129), іматиніб + фасудил (блок ROCK) та іматиніб + селінексор (блок ядерного експорту).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Antonenko, S. and Telegeev, G. (2020). Inhibition of USP1, a new partner of Bcr-Abl, results in decrease of Bcr-Abl level in K562 cells. *Experimental Oncology*, 42(2), pp. 109–114.
2. Bolte, S. and Cordelieres, F. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, 224(3), pp. 213–232.
3. Burthem, J., Rees-Unwin, K., Mottram, R., Adams, J., Lucas, G., Spooncer, E. and Whetton, A. (2007). The Rho-kinase inhibitors Y-27632 and fasudil act synergistically with imatinib to inhibit the expansion of ex vivo CD34+ CML progenitor cells. *Leukemia*, 21(8), pp. 1708–1714.
4. Chau, J., Vish, K., Boggon, T. and Stiegler, A. (2022). SH3 domain regulation of RhoGAP activity: Crosstalk between p120RasGAP and DLC1 RhoGAP. *Nature Communications*, 13, 4788.
5. Chereda, B. and Melo, J. (2015). Natural course and biology of CML. *Annals of Hematology*, 94(2), pp. 107–121.
6. Costes, S., Daelemans, D., Cho, E., Dobbin, Z., Pavlakis, G. and Lockett, S. (2004). Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophysical Journal*, 86(6), pp. 3993–4003.
7. Daubon, T., Chasseriau, J., El Ali, A., Rivet, J., Kitzis, A., Constantin, B. and Moreau, V. (2011). Differential motility and invasion competences of BCR-ABL+ leukemic cells: identification of RhoA/ROCK pathway as a new therapeutic target. *Molecular Oncology*, 5(3), pp. 243–252.
8. Doncheva, N., Morris, J., Gorodkin, J. and Jensen, L. (2019). Cytoscape stringApp: network analysis and visualization of proteomics data. *Journal of Proteome Research*, 18(2), pp. 623–632.
9. Druker, B., Talpaz, M., Resta, D., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J., Lydon, N., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S. and Sawyers, C. (2001). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in

- chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 344(14), pp. 1031–1037.
10. Druker, B., Guilhot, F., O'Brien, S., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M., Silver, R., Goldman, J., Stone, R., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B., Gabrilove, J., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J., Radich, J., Simonsson, B., Taylor, K., Baccarani, M., So, C., Letvak, L. and Larson, R. (2006). Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 355(23), pp. 2408–2417.
 11. Dunn, K., Kamocka, M. and McDonald, J. (2011). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, 300(4), pp. C723–C742.
 12. Elliott, A.D. (2020). Confocal microscopy: Principles and modern practices. *Current Protocols in Cytometry*, 92(1), e68.
 13. Ernst, J. and Kellis, M. (2017). Chromatin-state discovery and genome annotation with ChromHMM. *Nature Protocols*, 12(12), pp. 2478–2484.
 14. Fang, Z., Liu, X. and Peltz, G. (2023). GSEAPy: a comprehensive package for performing gene set enrichment analysis in Python. *Bioinformatics*, 39(1), btac757.
 15. Frey, Y., Franz-Wachtel, M., Macek, B. and Olayioye, M. (2022). Proteasomal turnover of the RhoGAP tumor suppressor DLC1 is regulated by HECTD1 and USP7. *Scientific Reports*, 12, 5036.
 16. Gumienny, R. (2018). GEOparse: Python library to access Gene Expression Omnibus (GEO). *GitHub*. Available at: <https://github.com/guma44/GEOparse> [Accessed 26 March 2026].
 17. Haferlach, T., Kohlmann, A., Wiczorek, L., Basso, G., Kronnie, G., Béné, M., De Vos, J., Hernández, J., Hofmann, W., Mills, K., Gilkes, A., Chiaretti, S., Shurtleff, S., Kipps, T., Rassenti, L., Yeoh, A., Papenhausen, P., Liu, W., Williams, P. and Foa, R. (2010). Clinical utility of microarray-based gene

- expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 28(15), pp. 2529–2537.
18. Healy, K., Hodgson, L., Kim, T., Shutes, A., Maddileti, S., Juliano, R., Hahn, K., Harden, T., Bang, Y. and Der, C. (2008). DLC-1 suppresses non-small cell lung cancer growth and invasion by RhoGAP-dependent and independent mechanisms. *Molecular Carcinogenesis*, 47(5), pp. 326–337.
 19. Hinsenkamp, I., Köhler, J., Flächsenhaar, C., Hitkova, I., Meessen, S., Gaiser, T., Wieland, T., Weiss, C., Röcken, C., Mowat, M., Quante, M., Taxauer, K., Mejias-Luque, R., Gerhard, M., Vogelmann, R., Meindl-Beinker, N., Ebert, M. and Burgermeister, E. (2022). DLC1 isoforms and their interaction with CagA in gastric cancer. *Cell Death Discovery*, 8, 358.
 20. Hu, Y., Liu, Y., Pelletier, S., Buchdunger, E., Warmuth, M., Fabbro, D., Hallek, M., Van Etten, R. and Li, S. (2004). Requirement of Src kinases Lyn, Hck and Fgr for BCR-ABL1-induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia. *Nature Genetics*, 36(5), pp. 453–461.
 21. Ianevski, A., Giri, A. and Aittokallio, T. (2022). SynergyFinder 3.0: an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), pp. W739–W743.
 22. Irizarry, R., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y., Antonellis, K., Scherf, U. and Speed, T. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, 4(2), pp. 249–264.
 23. Jabbour, E. and Kantarjian, H. (2018). Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *American Journal of Hematology*, 93(3), pp. 442–459.
 24. Jabbour, E. and Kantarjian, H. (2022). Chronic myeloid leukemia: 2022 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *American Journal of Hematology*, 97(9), pp. 1236–1256.

25. Jabbour, E. and Kantarjian, H. (2024). Chronic myeloid leukemia: 2025 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *American Journal of Hematology*, 99(11), pp. 2191–2212.
26. Jiang, S., Wang, F., Liu, Y., Wu, Y., Song, H., Liu, X., Zhang, H., Ye, W., Li, A., Zhang, M., Wang, M., Chen, L., Feng, X., Qu, L., Li, J., Wang, Z., Liu, Y., Wang, H., Chen, C., Guo, J., Yang, J., Wang, Y., Liu, M., Chen, M., Wang, J. and Wang, J. (2021). Suppression of USP7 induces BCR-ABL degradation and chronic myelogenous leukemia cell apoptosis. *Cell Death & Disease*, 12, 456.
27. Jiang, X. (2026). BCR:ABL1 Chimera Fusion. *BioRender*. Available at: <https://app.biorender.com/biorender-templates/details/t-654be6d381a277fb958575f2-bcrabl1-chimera-fusion> [Accessed 26 March 2026].
28. Kreider-Letterman, G., Carr, N. and Garcia-Mata, R. (2022). Fixing the GAP: The role of RhoGAPs in cancer. *European Journal of Cell Biology*, 101(2), 151209.
29. Li, X., Qi, J., Song, X., Xu, X., Pan, T., Wang, H., Yang, J. and Han, Y. (2022). DLC1 deficiency at diagnosis predicts poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology & Oncology*, 11(1), 74.
30. Lopez-Delisle, L., Rabbani, L., Wolff, J., Bhardwaj, V., Backofen, R. and Grüning, B. (2021). pyGenomeTracks: reproducible plots for multivariate genomic datasets. *Bioinformatics*, 37(3), pp. 422–423.
31. Maere, S., Heymans, K. and Kuiper, M. (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*, 21(16), pp. 3448–3449.
32. Mali, R., Ramdas, B., Ma, P., Shi, J., Munugalavadla, V., Sims, E., Wei, L., Vemula, S., Nabinger, S., Goodwin, C., Chan, R. and Kapur, R. (2011). Rho kinase regulates the survival and transformation of cells bearing oncogenic forms of KIT, FLT3, and BCR-ABL. *Cancer Cell*, 20(3), pp. 357–369.

33. Miki, K., Obara, N., Makishima, K., Sakamoto, T., Kusakabe, M., Kato, T., Kurita, N., Nishikii, H., Yokoyama, Y., Sakata-Yanagimoto, M., Hasegawa, Y. and Chiba, S. (2018). An unprecedented case of p190 BCR-ABL chronic myeloid leukemia diagnosed during treatment for multiple myeloma. *Case Reports in Hematology*, 2018, pp. 1–5.
34. Milacic, M., Beavers, D., Conley, P., Gong, C., Gillespie, M., Griss, J., Haw, R., Jassal, B., Matthews, L., May, B., Petryszak, R., Ragueneau, E., Rothfels, K., Sevilla, C., Shamovsky, V., Stephan, R., Tiwari, K., Varusai, T., Weiser, J., Wright, A., Wu, G., Stein, L., Hermjakob, H. and D'Eustachio, P. (2024). The Reactome Pathway Knowledgebase 2024. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), pp. D672–D678.
35. Molli, P., Pradhan, M., Advani, S. and Naik, N. (2012). RhoA: a therapeutic target for chronic myeloid leukemia. *Molecular Cancer*, 11, 16.
36. Morris, J., Apeltsin, L., Newman, A.M., Baumbach, J., Wittkop, T., Su, G., Bader, G.D. and Ferrin, T.E. (2011). clusterMaker: a multi-algorithm clustering plugin for Cytoscape. *BMC Bioinformatics*, 12, 436.
37. Radich, J., Dai, H., Mao, M., Oehler, V., Schelter, J., Druker, B., Sawyers, C., Shah, N., Stock, W., Willman, C., Friend, S. and Linsley, P. (2006). Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103(8), pp. 2794–2799.
38. Raney, B., Barber, G., Benet-Pagès, A., Casper, J., Clawson, H., Cline, M., Diekhans, M., Fischer, C., Navarro Gonzalez, J., Hickey, G., Hinrichs, A., Kuhn, R., Lee, B., Lee, C., Le Mercier, P., Miga, K., Nassar, L., Nejad, P., Paten, B., Perez, G., Schmelter, D., Speir, M., Wick, B., Zweig, A., Haussler, D., Kent, W. and Haeussler, M. (2024). The UCSC Genome Browser database: 2024 update. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), pp. D1082–D1088.
39. Ramirez, F., Dündar, F., Diehl, S., Grüning, B.A. and Manke, T. (2014). deepTools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 42(Web Server issue), pp. W187–W191.

40. Ramirez, F., Ryan, D.P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A.S., Heyne, S., Dündar, F. and Manke, T. (2016). deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), pp. W160–W165.
41. Reckel, S., Hamelin, R., Georgeon, S., Armand, F., Jolliet, Q., Chiappe, D., Moniatte, M. and Hantschel, O. (2017). Differential signaling networks of Bcr-Abl p210 and p190 kinases in leukemia cells defined by functional proteomics. *Leukemia*, 31(7), pp. 1502–1512.
42. Ren, G. and Li, G. (2021). Tumor suppressor gene DLC1: Its modifications, interactive molecules, and potential prospects for clinical cancer application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, pp. 264–275.
43. Robinson, J., Thorvaldsdóttir, H., Wenger, A., Zehir, A. and Mesirov, J. (2017). Variant review with the Integrative Genomics Viewer. *Cancer Research*, 77(21), pp. e31–e34.
44. Romano, J., Kromrey, J., Coraggio, J. and Skowronek, J. (2006). Appropriate statistics for ordinal level data: should we really be using t-test and Cohen's d for evaluating group differences on the NSSE and other surveys? In: *Annual Meeting of the Florida Association of Institutional Research*. Florida, 2006.
45. Sanchez-Solana, B., Wang, D., Qian, X., Velayoudame, P., Simanshu, D., Acharya, J. and Lowy, D. (2021). The tumor suppressor activity of DLC1 requires the interaction of its START domain with phosphatidylserine, PLCD1, and Caveolin-1. *Molecular Cancer*, 20(1), 141.
46. Sattler, M. and Griffin, J.D. (2003). Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene. *Seminars in Hematology*, 40(2), pp. 4–10.
47. Scholz, R., Regner, J., Theil, A., Erlmann, P., Holeiter, G., Jähne, R., Schmid, S., Hausser, A. and Olayioye, M. (2009). DLC1 interacts with 14-3-3 proteins to inhibit RhoGAP activity and block nucleocytoplasmic shuttling. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 1), pp. 92–102.
48. Shi, H., Guo, J., Duff, D., Rahmatpanah, F., Chitima-Matsiga, R., Al-Kuhlani, M., Taylor, K., Sjahputera, O., Andreski, M., Wooldridge, J. and Caldwell, C.

- (2007). Discovery of novel epigenetic markers in non-Hodgkin's lymphoma. *Carcinogenesis*, 28(1), pp. 60–70.
49. Sun, J., Hu, R., Han, M., Tan, Y., Xie, M., Gao, S. and Hu, J. (2024). Mechanisms underlying therapeutic resistance of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *International Journal of Biological Sciences*, 20(1), pp. 175–181.
50. Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A., Fang, T., Doncheva, N., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. and von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any of 14094 organisms. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), pp. D638–D646.
51. Taylor, K., Peña-Hernandez, K., Davis, J., Arthur, G., Duff, D., Shi, H., Rahmatpanah, F., Chitima-Matsiga, R., Wu, Y., Hickey, R., Dobrota, E., Caldwell, C. and Yuille, M. (2007). Large-scale CpG methylation analysis identifies novel candidate genes and reveals methylation hotspots in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Research*, 67(6), pp. 2617–2625.
52. Tripathi, B., Qian, X., Mertins, P., Wang, D., Papageorge, A., Carr, S. and Lowy, D. (2014). CDK5 is a major regulator of the tumor suppressor DLC1. *Journal of Cell Biology*, 207(5), pp. 627–642.
53. Tripathi, B., Grant, T., Qian, X., Zhou, M., Mertins, P., Wang, D., Papageorge, A., Tarasov, S., Hunter, K., Carr, S. and Lowy, D. (2017). Receptor tyrosine kinase activation of RhoA is mediated by AKT phosphorylation of DLC1. *Journal of Cell Biology*, 216(12), pp. 4255–4270.
54. Tripathi, B., Qian, X., Mertins, P., Wang, D., Papageorge, A. and Lowy, D. (2019). SRC and ERK cooperatively phosphorylate DLC1 and attenuate its Rho-GAP and tumor suppressor functions. *Journal of Cell Biology*, 218(10), pp. 3060–3076.
55. Tripathi, B., Anderman, M., Bhargava, D., Boccuzzi, L., Qian, X., Wang, D., Durkin, M., Papageorge, A., de Miguel, F., Politi, K., Walters, K., Doroshov, J. and Lowy, D. (2021). Inhibition of cytoplasmic EZH2 induces antitumor

- activity through stabilization of the DLC1 tumor suppressor protein. *Nature Communications*, 12, 6941.
56. Tripathi, B., Hirsh, N., Qian, X., Durkin, M., Wang, D., Papageorge, A., Lake, R., Evrard, Y., Marcus, A., Ramalingam, S., Dasso, M., Vousden, K., Doroshow, J., Walters, K. and Lowy, D. (2024). The pro-oncogenic noncanonical activity of a RAS GTP:RanGAP1 complex facilitates nuclear protein export. *Nature Cancer*, 5, pp. 1902–1918.
 57. Uhm, K., Lee, E., Lee, Y., Park, J., Kim, S., Kim, B., Kim, D., Kang, C. and Kim, S. (2009). Differential methylation pattern of ID4, SFRP1, and SHP1 between AML and CML. *Journal of Korean Medical Science*, 24(3), pp. 493–497.
 58. Ullmannova-Benson, V., Guan, M., Zhou, X., Tripathi, V., Yang, X., Zimonjic, D. and Popescu, N. (2009). DLC1 tumor suppressor gene inhibits migration and invasion of multiple myeloma cells through RhoA GTPase pathway. *Leukemia*, 23(2), pp. 383–390.
 59. Vallat, R. (2018). Pingouin: statistics in Python. *Journal of Open Source Software*, 3(31), 1026.
 60. Van Linden, O., Kooistra, A., Leurs, R., de Esch, I. and de Graaf, C. (2014). KLIFS: a knowledge-based structural database to navigate kinase-ligand interaction space. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(2), pp. 249–277.
 61. Wong, C., Yam, J., Ching, Y., Yau, T., Leung, T., Jin, D. and Ng, I. (2005). Rho GTPase-activating protein deleted in liver cancer suppresses cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, 63(14), pp. 3768–3775.
 62. Xue, W., Krasnitz, A., Lucito, R., Sordella, R., VanAelst, L., Cordon-Cardo, C., Singer, S., Kuehnel, F., Wigler, M., Powers, S., Zender, L. and Lowe, S. (2008). DLC1 is a chromosome 8p tumor suppressor whose loss promotes hepatocellular carcinoma. *Genes & Development*, 22(11), pp. 1439–1444.
 63. Yang, X., Popescu, N. and Zimonjic, D. (2011). DLC1 interaction with S100A10 mediates inhibition of in vitro cell invasion and tumorigenicity of

- lung cancer cells through a RhoGAP-independent mechanism. *Cancer Research*, 71(8), pp. 2916–2925.
64. Yang, X., Hu, F., Liu, J., Yu, S., Cheung, M., Liu, X., Ng, I., Guan, X., Wong, K., Sharma, R., Lung, H., Jiao, Y., Lee, L. and Cheung, M. (2020). Nuclear DLC1 exerts oncogenic function through association with FOXK1 for cooperative activation of MMP9 expression in melanom. *Oncogene*, 30(11), pp. 3833–3847.
65. Ying, J., Li, H., Murray, P., Gao, Z., Chen, Y., Wang, Y., Lee, K., Chan, A., Ambinder, R., Srivastava, G. and Tao, Q. (2007). Tumor-specific methylation of the 8p22 tumor suppressor gene DLC1 is an epigenetic biomarker for various types of lymphoma. *Epigenetics*, 2(1), pp. 15–21.
66. Youn, M., Smith, S., Lee, A., Chae, H., Spiteri, E., Erdmann, J., Galperin, I., Jones, L., Donato, M., Abidi, P., Bittencourt, H., Lacayo, N., Dahl, G., Aftandilian, C., Davis, K., Matthews, J., Kornblau, S., Huang, M., Sumarsono, N., Redell, M., Fu, C., Chen, I., Alonzo, T., Eklund, E., Gotlib, J., Khatri, P., Sweet-Cordero, E., Hijiya, N. and Sakamoto, K. (2021). Comparison of the transcriptomic signatures in pediatric and adult chronic myeloid leukemia. *Cancers*, 13(24), 6263.
67. Yuan, B., Jefferson, A., Baldwin, K., Thorgeirsson, S., Popescu, N. and Reynolds, S. (2003). DLC-1 operates as a tumor suppressor gene in human non-small cell lung carcinomas. *Oncogene*, 22(24), pp. 3799–3806.
68. Zhang, H., Cai, B., Liu, Y., Chong, Y., Matsunaga, A., Mori, S., Fang, X., Kitamura, E., Chang, C., Wang, P., Cowell, J. and Hu, T. (2023). RHOA promotes leukemogenesis of CML through the RHOA-SRF-IGFBP2 signaling axis. *Haematologica*, 108(8), pp. 2159–2172.
69. Zhong, D., Zhang, J., Yang, S., Soh, U.J., Buschdorf, J., Zhou, Y., Yang, D. and Low, B. (2009). The SAM domain of the RhoGAP DLC1 binds EF1A1 to regulate cell migration. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 3), pp. 414–424.