

Л.М. Ковалевська
А.С. Матвеева
О.В. Кашуба

Інститут експериментальної
патології, онкології
та радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: хронічний
лімфолейкоз, клітинні сигнальні
шляхи, фактори транскрипції,
біоінформатичний аналіз,
FunCoupr.

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ БІОІНФОРМАТИКИ ДЛЯ АНАЛІЗУ КЛІТИННИХ СИГНАЛЬНИХ ШЛЯХІВ

Мета: провести пошук клітинних сигнальних шляхів, які змінено у трансформованих В-лімфоцитах при хронічному лімфолейкозі (ХЛЛ). **Об'єкт і методи:** аналіз функціональних зв'язків (асоціацій) білків родини транскрипційних факторів SMAD та родини STAT було проведено з використанням бази даних та алгоритму FunCoupr. **Результати:** використовуючи алгоритм FunCoupr для аналізу функціональних зв'язків протеїнів родин SMAD і STAT показано, що основну роль у цих клітинних сигнальних шляхах відіграють протеїни SMAD4 та STAT5A. У результаті аналізу стало очевидним, що ці сигнальні шляхи перетинаються зі шляхами, які регулюють структуру хроматину. Вірогідно, що саме неактивність цілих ділянок хроматину зумовлює неможливість транскрипції SMAD4- та STAT5-залежних генів у трансформованих В-клітинах при ХЛЛ.

Хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ) — одна з найпоширеніших форм гемобластозів у Європі та США (близько 30%) [1]. Важливо відзначити, що для популяції далекого Сходу (особливо таких азіатських країн, як Японія, Корея і Китай) ХЛЛ є доволі рідкісною хворобою — на ці країни припадає менше 5–10% усіх випадків гемобластозів [2]. Частота захворюваності становить приблизно 3,5 на 100 тис. населення (5,0 для чоловіків та 2,5 — для жінок у США) [1, 3]. В Україні темп захворювання у 2016 р. становив 3,57 на 100 тисяч [4]. Схильність до захворювання часто є спадковою — ризик розвитку ХЛЛ у найближчих родичів у 7 разів перевищує медіану населення [5].

Більшості випадків ХЛЛ (якщо не всім) передують моноклональний В-клітинний лімфоцитоз, який виявляють у 5–10% людей віком старше 40 років і прогресує до ХЛЛ із частотою близько 1% на рік [5]. Середній вік чоловіків на момент захворювання становить 70 років, жінок — 74 роки. У людей віком молодше 50 років ХЛЛ виявляють дуже рідко, а у дітей така хвороба не діагностується. Можливо, це пов'язано із феноменом «старіння» імунних клітин, перш за все — плазматичних, які продукують антитіла при стимулюванні певними антигенами [6]. Виживаність пацієнтів із ХЛЛ після першого звернення становить приблизно 10 років, що є підвищенням за останню декаду [7].

Діагноз ХЛЛ встановлюють за наявності моноклональної популяції В-лімфоцитів у периферичній крові ($> 5 \cdot 10^9/\text{л}$) та інфільтрації цими клітинами кісткового мозку [8, 9]. Зазвичай при ХЛЛ реєструють мономорфні малі круглі В-лімфоцити із домішкою пре-В-клітин і наявністю характерних псевдофокулярних центрів проліферації (ви-

явлених у ході аналізу гістологічних зразків кісткового мозку) [8].

Наразі не запропоновано молекулярних механізмів ініціації та розвитку захворювання на ХЛЛ. Залишається невідомим, як і коли В-лімфоцити трансформуються у клітини ХЛЛ. Вважається, що ХЛЛ ініціюється множинними соматичними генетичними мутаціями та епігенетичними змінами, проте не існує чіткого набору специфічних мутацій або епігенетичних змін, які б дозволили провести ранню діагностику ХЛЛ або прогнозувати це захворювання [10–12].

Однією з гіпотез щодо походження ХЛЛ є накопичення довгоживучих імунологічно некомпетентних В-лімфоцитів, які майже не проліферують. Трансформовані В-клітини при ХЛЛ не здатні реагувати на різні стимули з мікросередовища. За нормальних умов існує ідеально настроєний баланс між факторами, що активують проліферацію клітин та/або апоптоз. Такі сигнали можуть бути трансдуковані через В-клітинний рецептор (BCR), який експресується на поверхні зрілих В-клітин, а також через рецептори хемокинів та цитокинів або безпосереднім контактом з іншими клітинами [5, 11, 13].

З іншого боку, незважаючи на відсутність проліферації в периферичній крові, В-лімфоцити при ХЛЛ експресують набір цитокинових рецепторів, а саме — рецепторів інтерлейкінів (IL)2R, IL4R, IL6R, IL10R, IL13R, а також рецепторів фактора некрозу пухлини альфа (tumor necrosis factor alpha — TNFA), інтерферонів альфа (interferon alpha — IFNA) та гамма (interferon gamma — IFNG), а також трансформуючого фактора росту бета (transforming growth factor beta — TGFB) [5, 14].

Зазначимо, що на сьогодні механізми, які створюють підґрунтя для розуміння як непроліферую-

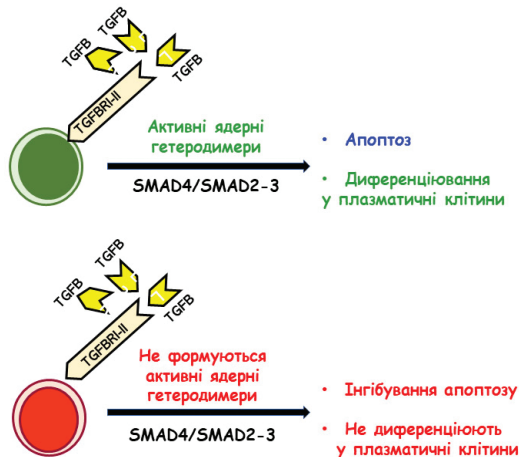


Рис. 1. Порівняння функціонування сигнального шляху TGFβ–SMAD2/3 у В-лімфоцитах та у трансформованих В-клітинах при ХЛЛ

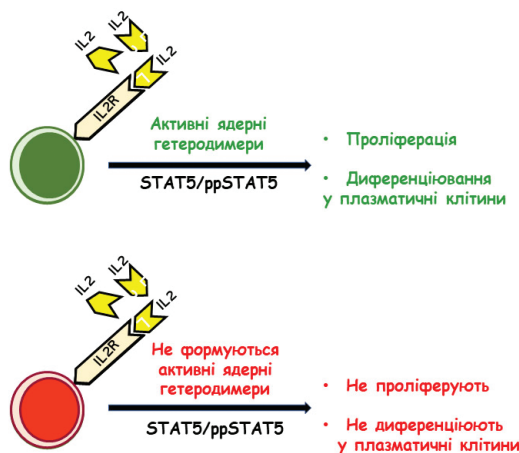


Рис. 2. Порівняння функціонування сигнального шляху IL2–JAK–STAT5 у В-лімфоцитах та у трансформованих В-клітинах при ХЛЛ

чі В-лімфоцити при ХЛЛ продукують цитокіни, залишаються не вивченими.

Одним із найважливіших цитокінів є TGFβ, який відіграє подвійну роль у канцерогенезі загалом. У лімфоїдних клітинах активний канонічний шлях TGFβ призводить до апоптозу. Встановлено, що активація шляху TGFβ призводить до індукції проапоптотичних генів *BMF*, *BIM* і внаслідок їх активації — до індукції гена *BAX*. Важливо відзначити, що у трансформованих В-лімфоцитах у разі лімфоми Беркіта при активації шляху TGFβ індуквалися гени, які кодують протеїни із антиапоптотичними властивостями, а саме — гени *BCL2L1* (*BCLXL*) та *BCL2*.

Нещодавно нами з'ясовано, що клітинний сигнальний шлях TGFβ–SMAD2/3 є неактивним на базальному рівні у трансформованих В-клітинах при ХЛЛ [15]. Нами встановлено, що протеїн SMAD2 практично не експресується у лейкоемічних клітинах, а також не формуються ядерні гетеродимери протеїнів SMAD3 і SMAD4, тому залежні гени не трансактивуються, і шлях TGFβ–SMAD2/3 ін-

гібовано [16]. Цей процес схематично представлений на рис. 1.

Ще один важливий активуючий шлях — IL2–JAK–STAT5 — є інактивованим у клітинах ХЛЛ на базальному рівні [17]. Незважаючи на високий рівень експресії генів *STAT2* та *STAT5*, гени, що регулюються димерами ppSTAT5/STAT5, у В-лімфоцитах при ХЛЛ знижені порівняно із В-лімфоцитами умовно здорових пацієнтів. Це може бути зумовлено високим рівнем розчинного IL2RA, або інгибуванням процесу фосфорилювання STAT5 (STAT5A має цитоплазматичну локалізацію, що свідчить про відсутність у ядрі комплексів, які активують транскрипцію залежних від фактора транскрипції STAT5 генів) [18] (спрощена схема представлена на рис. 2).

Підсумовуючи вищевикладене, відзначимо, що на сьогодні наявно дуже мало відомих факторів ризику розвитку хронічного лімфоцитарного лейкозу. Тому пошук клітинних сигнальних шляхів, які виявляються активованими або інгибованими у клітинах ХЛЛ, є важливим і актуальним завданням фундаментальних досліджень для експериментального обґрунтування нових підходів у лікуванні пацієнтів із ХЛЛ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Аналіз функціональних зв'язків (асоціацій) білків родини транскрипційних факторів SMAD та родини STAT проведено з використанням бази даних та алгоритму FunCoup (funcoup.sbc.su.se).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для розширення спектра клітинних шляхів, які можуть перетинатися із сигнальними каскадами TGFβ–SMAD2/3 та IL2–JAK–STAT5, що інактивуються на базальному рівні у трансформованих В-клітинах при ХЛЛ, було проведено біоінформатичний аналіз із використанням алгоритму FunCoup.

Існує декілька баз даних, в яких сконцентровано результати досліджень щодо клітинних шляхів. Однією з перших і найбільш відомих є KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). База даних KEGG містить багато інформації, особливо щодо геному людини, метаболічних та інших процесів у клітині [19].

База даних KEGG PATHWAY становить колекцію намальованих вручну карт клітинних шляхів, графічно представляючи експериментальні результати, отримані при вивченні метаболізму, проліферації, апоптозу, сигналіну та інших клітинних процесів. За допомогою KEGG PATHWAY можна знайти місце певного протеїну у тому чи іншому клітинному шляху. Більше того, така база даних дозволяє також показати роль хімічних сполук, окремих генів або білків у розвитку ряду хвороб. Проте база KEGG PATHWAY не враховує багатьох даних, наприклад взаємодію білків, рівень експресії генів, коекспресію генів тощо.

Розширені можливості порівняно із KEGG PATHWAY притаманні алгоритму FunCoup [20, 21]. Назва FunCoup означає функціональні взаємодії (**functional coupling**). Наразі FunCoup є основою для загальногеномних функціональних зв'язків у 21 модельному організмі. Функціональним зв'язком, або функціональною асоціацією вважають неспецифічну форму асоціації, яка охоплює як пряму фізичну взаємодію, так і більш загальні типи прямої чи непрямої взаємодії, такі як регуляторна взаємодія або участь у тому самому клітинному процесі чи клітинному сигнальному (і не лише!) шляху. Підсумовуючи характеристику алгоритму FunCoup, слід наголосити, що цей алгоритм інтегрує 10 різних типів доказів, отриманих із масивів даних про геноміку та протеоміку, інтегрованих за допомогою статистики Байєса (Bayesian integration procedure).

Тому саме алгоритм FunCoup було вибрано для біоінформатичного аналізу взаємодії вищезазначених сигнальних шляхів.

Ген *SMAD2* (Gene ID: 4087) людини міститься на 18-й хромосомі та кодує протеїн масою 58 кДа. Результати аналізу функціональних зв'язків *SMAD2* свідчать, що найсильніше цей білок пов'язаний з іншими протеїнами своєї родини, він бере участь у сигнальному каскаді TGFB (рис. 3). Також *SMAD2* має тісні зв'язки з білками HDAC1 та HDAC2, які за функціями належать до репресорів, гідролаз, регуляторів хроматину. Білок *SMAD2* задіяний у таких біологічних процесах, як взаємодія хазяїн–вірус, транскрипція, регуляція транскрипції, біологічні ритми [22, 23].

Ген *SMAD3* (Gene ID: 4088) міститься на короткому плечі 15-ї хромосоми, його білок має молекулярну масу 48 кДа, та містить у своєму складі два функціональні домени, відомі як MH1 і MH2. *SMAD3* у клітині бере участь у сигнальних шляхах факторів росту та у диференціюванні, причому в ці шляхи входять молекули ALK-4, -5 або -7 (рецепторні кінази активіну); один із цих шляхів залежить як від TGFB і його ліганду активіну, так і від іншого члена родини TGFB — фактора диференціації росту 8 (GDF-8, міостатин). *SMAD3* в основному функціонує в сигнальному шляху цитокінів, які діють через gp130 та кінази сімейства Janus, включаючи інтерлейкін-6 (IL-6), інгібітор лейкемії (LIF) та онкостатин M [24] (рис. 4).

Ген *SMAD4* (Gene ID: 4089), відомий ще як *DPC4 JIP*, *MADH4*, *MYHRS*, кодує 552 амінокислотний поліпептид із молекулярною масою 60 кДа. Білок *SMAD4*, як і інші члени цієї родини, має два функціональні домени — MH1 і MH2. Білок у нормальних умовах зосереджений переважно в цитоплазмі й формує кристалографічний тример через консервативний інтерфейс білок-білкової взаємодії [25]. Цей протеїн фосфорилується і активується трансмембранними кіназами серин-треонінових рецепторів у відповідь на трансформуючий сигнал TGFB за кількома шляхами [26].

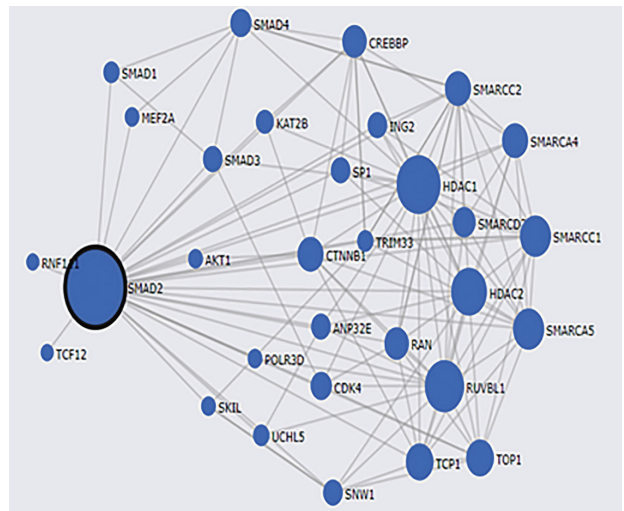


Рис. 3. Аналіз функціональних зв'язків протеїну *SMAD2* за допомогою бази даних та алгоритму FunCoup

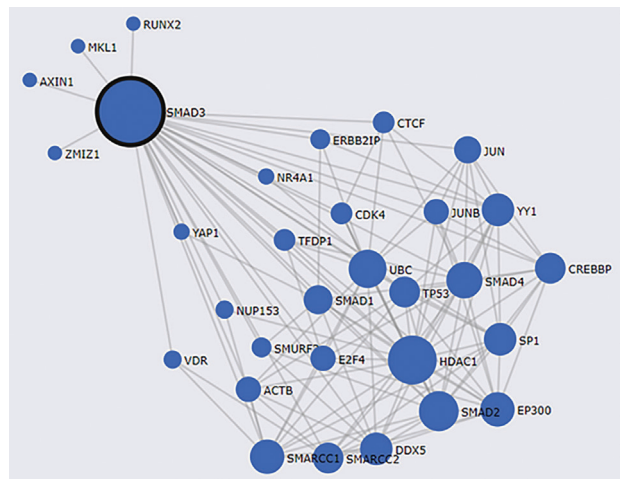


Рис. 4. Аналіз функціональних зв'язків протеїну *SMAD3* за допомогою бази даних та алгоритму FunCoup

SMAD4 є супресором канцерогенезу, але часто мутує. Сам по собі не ініціює формування пухлин, але спричиняє пухлинний ріст, ініційований іншими генами (такими як мутований *KRAS* в аденокарциномі протоки підшлункової залози та інактивованій *APC* у разі раку прямої кишки) [27]. Втрата *SMAD4* відіграє важливу ініціативну роль, порушуючи реакцію клітин на пошкодження ДНК, гальмуючи відновлюючі механізми та посилюючи геномну нестабільність [28]. Результати біоінформатичного аналізу свідчать, що *SMAD4* тісно пов'язаний із ключовими гравцями сигнальних каскадів, які відповідають за стабільність геному (рис. 5), та має тісні зв'язки з іншими членами родини *SMAD*, а саме *SMAD1*, *SMAD2* та *SMAD9*. Також *SMAD4* впливає на транскрипційні фактори *JUNB*, *JUN* та *E2F4*. Причому *E2F4* є транскрипційним репресором, активність якого критично важлива для зупинки клітинного циклу в G_0/G_1 , разом із членами родини білків ретинобластоми (RB) [29].

Ген *STAT2* (GeneID: 6773) (також відомий як *ISGF-3*, *P113*, *STAT113*, *IMD44*) кодує протеїн, який є трансдуктором сигналу й активатором транскрипції.

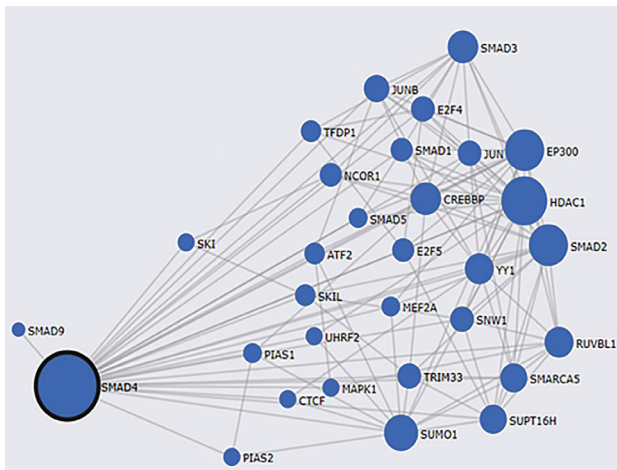


Рис. 5. Аналіз функціональних зв'язків протеїну SMAD4 за допомогою бази даних та алгоритму FunCoup

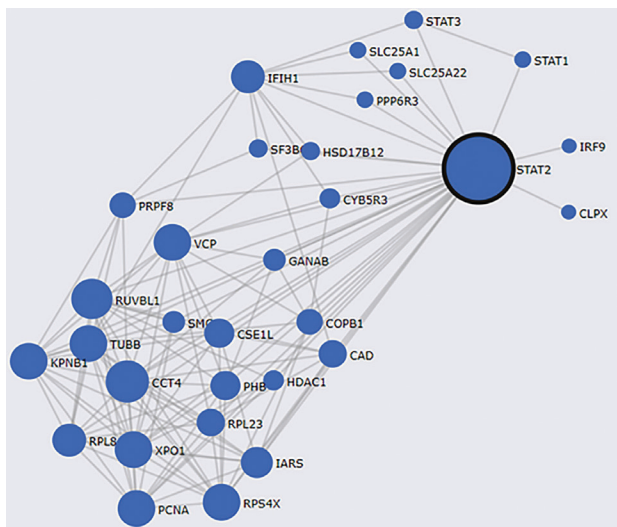


Рис. 6. Аналіз функціональних зв'язків протеїну STAT2 за допомогою бази даних та алгоритму FunCoup

ції 2, PTORCH3. Цей білок містить 851 амінокислоту, молекулярна маса білка — 113 кДа. Ген розміщений на 12-й хромосомі людини. Протеїн STAT2 діє як трансактиватор, проте сам не має здатності зв'язуватися безпосередньо з ДНК [30].

Фактор транскрипції STAT2 важливий для активації транскрипції через рецептори інтерферонів IFN- α - β (IFNAR) та - λ (IFNLR) та пов'язаних з ними білків — адаптерів JAK. Після фосфорилювання тирозину STAT2 та STAT1 утворюють гомо- або гетеродимери, які асоціюються з IRF9/ISGF3G та утворюють складний комплекс — фактор транскрипції ISGF3. Саме в такому партнерстві STAT2 потрапляє в ядро. Щоб активувати транскрипцію стимульованих генів інтерферону, які викликають у клітині відповідь на дію вірусу, фактор транскрипції ISGF3 зв'язується з IFN-стимульованим елементом відповіді (ISRE) [30].

Протеїн STAT2 діє також як регулятор ділення мітохондрій, модулюючи фосфорилювання білка DNMI1 за Ser-616 та Ser-637 (які відповідно активують та інактивують активність GTPase DNMI1) [31]. Після імпорту в ядро фосфорилюваний STAT2 про-

тягом години знову переходить до цитоплазми, що координується із процесом його дефосфорилювання в ядрі. Встановлено, що STAT2 негативно регулює передачу сигналів IFN γ , утворюючи непродуктивний комплекс зі STAT1 [32]. Високу експресію STAT2 пов'язують із поганим прогнозом у хворих на рак яєчника. Результати біоінформатичного аналізу свідчать, що STAT2 утворює стійкі зв'язки з протеїнами STAT1, STAT3, IRF9, CLPX (рис. 6) та опосередковано зв'язується з PCNA, GANAB, HDAC1 і багатьма іншими молекулами.

Ген *STAT5A* (GeneID: 6776) (Signal Transducer And Activator Of Transcription 5A) відомий також як *MGF*, *STAT5*. Ген розміщений на короткому плечі 17-ї хромосоми і кодує протеїн із молекулярною масою 90,5 кДа. Білок STAT5A на 96% є гомологом STAT5B і відрізняється від нього лише двадцятьма амінокислотами. Білок STAT5A є членом родини транскрипційних факторів STAT, має сайт для зв'язування із ДНК. Показана як цитоплазматична, так і ядерна локалізація STAT5A. У відповідь на дію цитокінів та факторів росту протеїни родини STAT фосфорилюються пов'язаними з рецепторами кіназами та утворюють гомо- або гетеродимери, які транслюються до клітинного ядра, де діють як активатори транскрипції. STAT5A активується і опосередковує відповіді багатьох клітинних лігандів, таких як IL2, IL3, IL7 GM-CSF, еритропоетин, тромбопоетин та різні гормони росту. Активація цього білка при мієломі та лімфомі пов'язана зі злиттям гена *TEL/JAK2* та не залежить від стимулювання клітин і має важливе значення для пухлинного росту [33].

Відомо, що активація FLT3 (мембранного білка, рецептора цитокінів, який належить до рецепторів тирозин кіназ третього класу) запускає слабку активацію STAT5A, в той же час мутації в FLT3, які роблять білок постійно активним, призводять до постійної активації STAT5A і в подальшому — до проліферації клітини і блокування механізмів апоптозу [34].

Біоінформатичний аналіз показав, що серед стійких зв'язків протеїну STAT5A виділяються члени родини білків JAK та CDK. Сильні асоціації виявлено з іншими членами родини STAT, а саме — STAT1 та STAT5B (рис. 7). Також білок STAT5A взаємодіє із HDAC1, MAPK1 та MAPK3. Як наслідок цього STAT5A задіяний у таких біологічних процесах, як транскрипція, регуляція транскрипції, альтернативний сплайсинг. Білок STAT5A впливає на процеси клітинної проліферації шляхом регуляції як PI3K/Akt, так і Ras-/MAPK-шляхів.

Ген *STAT5B* (GeneID: 6777) (Signal Transducer And Activator Of Transcription 5B) відомий також як *GHISID2*, *STAT5* [35, 36]. Ген *STAT5B* розміщений на короткому плечі 17-ї хромосоми поруч зі *STAT5A* та *STAT3*. Кодований ним білок STAT5B з молекулярною масою 117 кДа містить 793 амінокисло-

ти. Показано, що мутація у гені *STAT5B* (мутант *STAT5BN642H*) призводить до активації кодового протеїну у разі великозернистого лімфоцитарного лейкозу [37, 38]. Наявність мутації призводила до більш агресивного перебігу патологічного процесу. Дані літератури свідчать також, що опосередкований TGF-альфа/EGFR аутокринний ріст трансформованих епітеліальних клітин залежить від активації *STAT5A*, але не *STAT5B* [39].

Аналіз за алгоритмом FunCoup показав, що на відміну від *STAT5A*, *STAT5B* має стійкий зв'язок з усією родиною JAK тільки з *JAK2* (рис. 8).

Шлях JAK-STAT є важливим сигнальним каскадом у фізіологічній регуляції різних клітинних функцій, включаючи імунну відповідь, проліферацію, апоптоз та диференціювання. Із шести різних білків *STAT* тандем *STAT5A* та *STAT5B* відіграє головну роль у кровотворенні. Конститутивна активація *STAT5* є ключовою подією в патогенезі ряду гематологічних злоякісних новоутворень [39].

Мутації у послідовностях білків *STAT3* та *STAT5B* пов'язані зі збільшенням фосфорильованого білка та постійної проліферації трансфікованих клітинних ліній або нормальних NK-клітин [31]. Проліферативна активність, що стимулює ріст клітин, що експресують мутантні протеїни, частково пригнічується інгібітором JAK1/2. Це може бути використано при розробленні терапевтичної стратегії [40]. Важлива роль *STAT5B*, але не *STAT5A*, продемонстрована в патогенезі онкогематологічних захворювань, при яких спостерігається транслокація BCR/ABL [41], причому в таких випадках *STAT5A* вважається супресором пухлинного росту [42]. Тому на сьогодні актуальним залишається питання пошуку способів пригнічення активності протеїну *STAT5*, що уможливило розроблення лікарських засобів для онкогематології.

ВИСНОВКИ

Таким чином, аналізуючи функціональні зв'язки протеїнів родин SMAD і STAT, встановлено, що основними молекулами у цих клітинних сигнальних шляхах є протеїни SMAD4 та *STAT5A*. У результаті аналізу стало очевидним, що ці сигнальні шляхи перетинаються зі шляхами, що регулюють структуру хроматину. Можливо, саме неактивність цілих ділянок хроматину зумовлює неможливість транскрипції SMAD4- та *STAT5*-залежних генів у трансформованих В-клітинах при ХЛЛ. Це питання потребує вивчення у майбутньому.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; **60** (5): 277–300.
2. Mahlich J, Okamoto S, Tsubota A. Cost of illness of Japanese patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL), and budget impact of the market introduction of ibrutinib. *Pharmacoecon Open* 2017; **1** (3): 195–202.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017; **67** (1): 7–30.
4. НКРУ (<http://www.ncru.inf.ua> 2018).

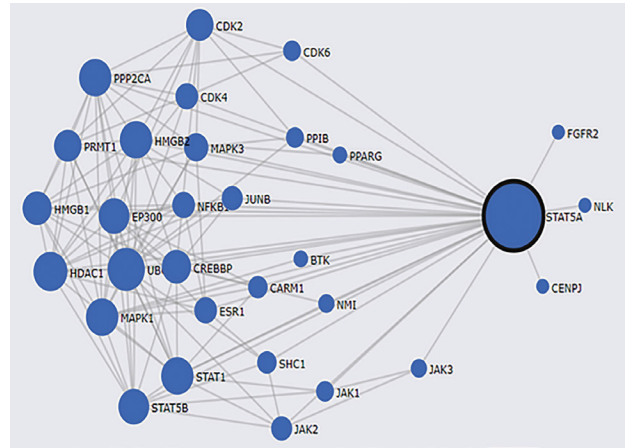


Рис. 7. Аналіз функціональних зв'язків протеїну *STAT5A* за допомогою бази даних та алгоритму FunCoup

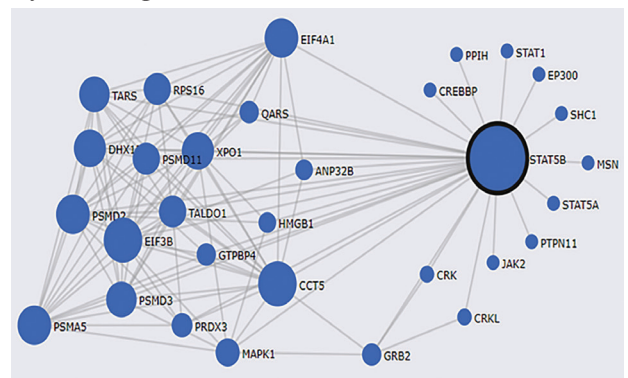


Рис. 8. Аналіз функціональних зв'язків протеїну *STAT5B* за допомогою бази даних та алгоритму FunCoup

5. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature reviews Cancer* 2016; **16** (3): 145–162.
6. Scarfo L, Dagklis A, Scielzo C, *et al.* CLL-like monoclonal B-cell lymphocytosis: are we all bound to have it? *Semin Cancer Biol* 2010; **20** (6): 384–390.
7. Gaidano G, Foa R, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2012; **122** (10): 3432–8.
8. Gluzman DF, Sklyarenko LM, Koval SV, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia and acute myeloid leukemias in structure of hematological malignancies in ukrainian population in post-chernobyl period. *Oncology* 2017; **19** (1): 33–44 (in Russian).
9. Filchenkov AA, Gluzman DF, Ivanivska TS. New differentiative antigens of normal and neoplastic blood-forming and lymphoid cells (according to the materials of international working 10). *Oncology* 2019; **21** (2): 101–12 (in Russian).
10. Hallek M. Therapy of chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010; **23** (1): 85–96.
11. Haselager MV, Kater AP, Eldering E. Proliferative Signals in Chronic Lymphocytic Leukemia; What Are We Missing? *Front Oncol* 2020; **10**: 592205. doi: 10.3389/fonc.2020.592205.
12. Sivina M, Xiao L, Kim E, *et al.* CXCL13 plasma levels function as a biomarker for disease activity in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2020. doi: 10.1038/s41375-020-01063-7.
13. Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, *et al.* Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2012; **209** (12): 2183–98.
14. Dasgupta A, Mahapatra M, Saxena R. A study for proposal of use of regulatory T cells as a prognostic marker and establishing

an optimal threshold level for their expression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2015; **56** (6): 1831–8.

15. Matveeva A, Kovalevska L, Kholodnyuk I, *et al.* The TGF-beta — SMAD pathway is inactivated in chronic lymphocytic leukemia cells. *Exp Oncol* 2017; **39** (4): 286–90.

16. Matveeva AS, Kovalevska LM, Kashuba EV. SMAD4 transcription factor is localized in the cytoplasm of cells of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). Factors in experimental evolution of organisms 2018; **22**: 144–8.

17. Matveeva A, Kovalevska L, Polischuk A, Kashuba E. The IL-2-STAT5 pathway is blocked in chronic lymphocytic leukemia cells. *Онкологія* 2017; **19** (4): 247–53.

18. Matvieieva AS, Kovalevska LM, Ivanivska TS, *et al.* The STAT5 transcription factor in B-cells of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Biopolym Cell* 2019; **35** (1): 30–8.

19. Ogata H, Goto S, Sato K, *et al.* KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* 1999; **27** (1): 29–34.

20. Alexeyenko A, Sonnhammer EL. Global networks of functional coupling in eukaryotes from comprehensive data integration. *Genome Res* 2009; **19** (6): 1107–16.

21. Schmitt T, Ogris C, Sonnhammer EL. FunCoup 3.0: database of genome-wide functional coupling networks. *Nucleic Acids Res.* 2014; **42** (Database issue): D380–388. doi: 10.1093/nar/gkt984.

22. Thambyrajah R, Fadlullah M, Proffitt M, *et al.* HDAC1 and HDAC2 Modulate TGF-beta Signaling during Endothelial-to-Hematopoietic Transition. *Stem Cell Reports* 2018; **10** (4): 1369–83.

23. Stojanovic N, Hassan Z, Wirth M, *et al.* HDAC1 and HDAC2 integrate the expression of p53 mutants in pancreatic cancer. *Oncogene* 2017; **36** (13): 1804–15.

24. Itoh Y, Saitoh M, Miyazawa K. Smad3-STAT3 crosstalk in pathophysiological contexts. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2018; **50** (1): 82–90.

25. Shi Y, Hata A, Lo R, *et al.* A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature* 1997; **388** (6637): 87–93.

26. Zhao M, Mishra L, Deng C. The role of TGF-beta/SMAD4 signaling in cancer. *Int J Biol Sci* 2018; **14** (2): 111–23.

27. Peterson L, Kovyrshina T. Progression inference for somatic mutations in cancer. *Heliyon* 2017; **3** (4): e00277. doi: 10.1016/j.heliyon.2017.e00277.

28. McCarthy A, Chetty R. Smad4/DPC4. *J Clin Pathol* 2018; **71** (8): 661–4.

29. Hsu J, Sage J. Novel functions for the transcription factor E2F4 in development and disease. *Cell Cycle* 2016; **15** (23): 3183–90.

30. Hambleton S, Goodbourn S, Young D, *et al.* STAT2 deficiency and susceptibility to viral illness in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110** (8): 3053–308.

31. Shahni R, Cale CM, Anderson G, *et al.* Signal transducer and activator of transcription 2 deficiency is a novel disorder of mitochondrial fission. *Brain* 2015; **138**(Pt 10): 2834–46.

32. Ho J, Pelzel C, Begitt A, *et al.* STAT2 is a pervasive cytokine regulator due to its inhibition of STAT1 in multiple signaling pathways. *PLoS Biol* 2016; **14** (10): e2000117. doi: 10.1371/journal.pbio.2000117.

33. Heltemes-Harris LM, Farrar MA. The role of STAT5 in lymphocyte development and transformation. *Curr Opin Immunol* 2012; **24** (2): 146–52.

34. Dumas PY, Naudin C, Martin-Lannere S, *et al.* Hematopoietic niche drives FLT3-ITD acute myeloid leukemia resistance to quizartinib via STAT5-and hypoxia-dependent upregulation of AXL. *Haematologica* 2019; **104** (10): 2017–27.

35. Malin S, McManus S, Busslinger M. STAT5 in B cell development and leukemia. *Curr Opin Immunol* 2010; **22** (2): 168–76.

36. Malin S, McManus S, Cobaleda C, *et al.* Role of STAT5 in controlling cell survival and immunoglobulin gene recombination during pro-B cell development. *Nat Immunol* 2010; **11** (2): 171–9.

37. Rajala HL, Mustjoki S. STAT5b in LGL leukemia—a novel therapeutic target? *Oncotarget* 2013; **4** (6): 808–9.

38. Rajala HL, Eldfors S, Kuusanmaki H, *et al.* Discovery of somatic STAT5b mutations in large granular lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; **121** (22): 4541–50.

39. Tolomeo M, Meli M, Grimaudo S. STAT5 and STAT5 Inhibitors in Hematological Malignancies. *Anticancer Agents Med Chem* 2019; **19** (17): 2036–4206.

40. de Araujo ED, Erdogan F, Neubauer HA, *et al.* Structural and functional consequences of the STAT5B(N642H) driver mutation. *Nat Commun* 2019; **10** (1): 2517.

41. Nowicki MO, Falinski R, Koptysa M, *et al.* BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks. *Blood* 2004; **104** (12): 3746–53.

42. Kollmann S, Grundschober E, Maurer B, *et al.* Twins with different personalities: STAT5B—but not STAT5A—has a key role in BCR/ABL-induced leukemia. *Leukemia* 2019; **33** (7): 1583–97.

APPLICATION OF BIOINFORMATICS FOR ANALYSIS OF CELLULAR SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS

L.M. Kovalevska, A.S. Matvieieva, E.V. Kashuba

RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine,
Kyiv, Ukraine

Aim: to perform a search for cellular signaling pathways that are altered in transformed B-lymphocytes at chronic lymphocytic leukemia (CLL). **Object and methods:** the FunCoup algorithm was used to search for genomic functional associations for SMAD and STAT family proteins. **Results:** using the FunCoup algorithm to analyze the functional relationships of SMAD and STAT family proteins, it was shown that SMAD4 and STAT5A proteins play the main role in these cellular signaling pathways. Moreover, the analysis showed that these signaling pathways intersect with the pathways, regulating chromatin structure. It is likely that the inactivity of the certain areas of chromatin might cause the inability to transactivate the SMAD4- and STAT5-dependent genes in transformed B-cells at CLL.

Key Words: chronic lymphocytic leukemia, signal transduction pathways, transcription factors, bioinformatics analysis, FunCoup.

Адреса для листування:

Кашуба О.В.

Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
вул. Васильківська, 45, Київ, 03022
E-mail: Kashuba@nas.gov.ua

Одержано: 25.11.2020