



استكشاف مثبطات نوعية محتملة للقارئ وفق الوراثة *UHRF1* كاستراتيجية جديدة لمعالجة السرطان

إعداد الطالب

أسعد إبراهيم الخليل كيالي

رسالة مقدمة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الدكتوراه في الكيمياء الحيوية

إشراف

د. محمود الحسين

الأستاذ المشارك – الكيمياء الحيوية

أ.د. فهد العباسي

الأستاذ – الكيمياء الحيوية

قسم الكيمياء الحيوية

كلية العلوم

جامعة الملك عبد العزيز

جدة – المملكة العربية السعودية

١٤٤٣ هـ - ٢٠٢٢ م



استكشاف مشبّطات نوعية محتملة للقارئ وفق الوراثة *UHRF1* كاستراتيجية جديدة لمعالجة السرطان

إعداد الطالب

أسعد إبراهيم الخليل كيالي

رسالة مقدمة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الدكتوراه في الكيمياء الحيوية

كلية العلوم

جامعة الملك عبد العزيز

جدة - المملكة العربية السعودية

١٤٤٣ هـ - ٢٠٢٢ م

المستخلص

السرطان هو أحد أبرز الأسباب للوفاة بين البشر. يتم تصنيفه على أنه مرض متعدد العوامل يبدأ بسبب خلل في تنظيم الجينات المختلفة في جسم الإنسان، مما يزيد الحاجة إلى إيجاد أدوية محددة تعمل من خلال استهداف مسارات إشارات محددة. يمكن أن تؤدي الآليات المختلفة، بما في ذلك التعديلات الجينية، والتعديلات فوق جينية، وعملية الوبكنة (Ubiquitination) إلى تطور السرطنة. تتضمن آليات الفوق جينية، مثيلة الحمض النووي، وتغييرات الهيستون بعد الترجمة، والحمض النووي الريبي غير المشفر. يُعتقد أن الإسكات الفوق جيني للجينات الكابتة للورم (TSGs) هو أحد المسارات الرئيسية لآلية تحفيز بدء الورم وتطوره. ونظرًا لإمكانية عكسها، جذبت التعديلات الفوق جينية الانتباه كأهداف مثيرة للاهتمام في الوقاية من السرطان وعلاجه.

القارئ الفوق جيني ((UHRF1) الذي يحتوي عدة مجالات) متوفر بشكل كبير في مختلف أنواع السرطان ويشترك في الإسكات الفوق جيني للعديد من للجينات الكابتة للورم (TSGs) من خلال مثيلة الحمض النووي وآليات نزع استلة الهيستون. مما يؤدي إلى تعزيز تكاثر الخلايا وخلل في موت الخلايا المبرمج.

يحتوي UHRF1 على خمسة مجالات وظيفية تمكنه من الارتباط بالعديد من لاعبين الوراثة الفوق جينية الأخرى مثل (DNMT1 (DNA Methyltransferase 1)، HDAC1 (histone deacetylase 1)، HAUSP و the histone methyltransferase G9a ، Tip60 (histone acetyltransferase) (Herpes virus-associated Ubiquitin-Specific Protease) و من خلال هذه التفاعلات ، يمكن لـ UHRF1 ربط مثيلة الحمض النووي بعلامات هيستون الفوق جينية وبالتالي ضمان توريثها خلال انقسام الخلية. من ناحية أخرى، فقد ثبت أن UHRF1 يتم تنظيمه من خلال العديد من المسارات بما في ذلك الجين الكابت للورم p73 و تثبيط الوبكنة لـ HAUSP (deubiquitinase HAUSP) . في الواقع، تعتبر مستويات التعبير المنخفضة لـ p73 والمرتفعة لـ HAUSP من الأسباب الرئيسية لمستويات التعبير العالية لـ UHRF1.

يكون مستوى التعبير للـ p73 منخفضا في العديد من الأورام الخبيثة ذات الطفرات في p53 من خلال آليات متعددة بما في ذلك مسار الوبكنة. لذلك، فإن دراسة وفهم مسار إشارات الوبكنة البروتينازومي (ubiquitin proteasome) في تنظيم مسار p73 سيساعد على تحديد مسار الإشارات هذا وإيجاد استراتيجية علاجية جديدة ومتميزة لمحاربة السرطان. تشارك مجموعة من إنزيمات (E3 ubiquitin ligase) في تنظيم التعبير عن p73 في الخلايا السرطانية ذات الطفرة في p53، مثل خلايا سرطان الدم (Jurkat)، وخلايا (HL60)، وخلايا (MDA-MB-468).

HAUSP ، المعروف أيضًا باسم Ubiquitin Specific Protease 7 ، له أدوار مهمة في العمليات الخلوية، مثل علم الوراثة فوق الجيني ، وعلم الأحياء الكروماتيدي ، وذلك من خلال تنظيم مسارات الإشارات المختلفة بما في ذلك استهداف UHRF1. في الواقع، ينتمي HAUSP إلى مجمع "ECREM" لآلات نسخ الشفرات فوق جينية، والذي يحتوي أيضًا على العديد من مشغلات الوراثة فوق جينية، مثل UHRF1 وHDAC1 وDNMT1 وG9a بالإضافة إلى TIP60. نظرًا لنشاطه في نزع الكوبنة deubiquitinase وقدرته على الارتباط مباشرة بالمنظّمين فوق جينيين الآخرين في مجمع ECREM، فإن HAUSP يضع نفسه في أعلى القائمة التنظيمية.

كان الهدف من دراستي هو فهم الآليات التنظيمية المشاركة في تنظيم كل من الجين الكابح للورم p73 و HAUSP deubiquitinase وإيجاد مثبطات جديدة قادرة على استهداف مسارين الإشارة وعلى وجه الخصوص UHRF1. الثايموكوينون (TQ) هو العنصر الفعال الرئيسي الموجود في زيت الحبة السوداء المستخرج من حبة البركة. ثبت أن TQ يقلل من تنظيم UHRF1 في خلايا سرطان الدم من خلال آلية غير معروفة تتضمن زيادة تنظيم p73 وتقليل تنظيم HAUSP.

أظهرت بيانات تسلسل الحمض النووي الريبي RNA-seq أن العديد من إنزيمات E3 ubiquitin-ligase ، التي ستشارك في تثبيط p73 بما في ذلك Itch و Pirh2 و E3s Pin2 و Mdm2 و TRIM32 و SCF^{FBXO45} تم تثبيطها في خلايا Jurkat استجابةً لـ TQ. من بين الجينات المستهدفة Itch تم تثبيطه بشكل ملفت للانتباه في خلايا Jurkat المعالجة بـ TQ مقارنةً بخلايا التحكم. تم تأكيد تثبيط التنظيم الناجم عن TQ بواسطة RT-PCR في خلايا Jurkat وخلايا MDA-MB-468 و HL60. نتج عن علاج خلايا Jurkat باستخدام TQ أو مثبط البروتوزوم MG132 في حدوث زيادة تنظيم لـ p73 مما يشير إلى أن TQ يمكن أن يكون مثبطًا واعدًا لـ E3-ubiquitin ligase Itch مما يؤدي إلى زيادة تنظيم مثبط الورم p73 في السرطانات التي عن يكون فيها p53 متحولًا.

كشفت بيانات تسلسل الحمض النووي الريبي أيضًا أن TQ يقلل بشكل كبير من تعبير HAUSP. وتسبب TQ في تسريع عملية الوبكنة للـ UHRF1 كخطوة أولى في تفكيكه وتثبيط التكاثر الخلوي. يرتبط انتشار UHRF1 الناجم عن TQ بتقليل تنظيم HAUSP. أظهرت النتائج التي توصلنا إليها أيضًا أن عقار دوكسوروبيسين (doxorubicin) المضاد للسرطان تسبب في خفض تنظيم UHRF1 بطريقة مماثلة للجرعة والوقت في الخلايا السرطانية بطريقة مماثلة للـ TQ ، لكن UHRF1 لم يخضع للوبكنة كما تم اكتشافه سابقًا استجابةً لـ TQ. علاوة على ذلك، قلل TQ من التعبير عن الجين الورمي Bcl-2 دون التسبب في وبكنته مثل UHRF1. تشير هذه النتائج معًا إلى أن الوبكنة السريعة للـ UHRF1 هو حدث حتمي استجابةً لـ TQ ولكن ليس لاستجابته لدوكسوروبيسين (doxorubicin). يبدو أن TQ يؤدي أيضًا إلى وبكنة UHRF1 ولكن ليس للجين الورمي Bcl-2، وبالتالي تحديد UHRF1 كهدف محدد لـ TQ لمحاربة السرطان.



Exploring potential specific inhibitors of the epigenetic reader UHRF1 as a new strategy of cancer treatment

By
Asaad Kayali

A thesis submitted in partial fulfillment for the degree of Doctor of
Philosophy in Science
(Biochemistry)

FACULTY OF SCIENCE
KING ABDULAZIZ UNIVERSITY
JEDDAH- SAUDI ARABIA
1443H- 2022G



Exploring potential specific inhibitors of the epigenetic reader UHRF1 as a new strategy of cancer treatment

**By
Asaad Kayali**

**A thesis submitted in partial fulfillment for the degree of Doctor of
Philosophy in Science
(Biochemistry)**

Supervised by

Dr. Mahmoud Alhosin (PI)
Associate Professor of Biochemistry
Faculty of Science - King Abdulaziz University

Prof. Fahad A. Al-Abbasi (Co-PI)
Professor of Biochemistry
Faculty of Science - King Abdulaziz University

**FACULTY OF SCIENCE
KING ABDULAZIZ UNIVERSITY
JEDDAH- SAUDI ARABIA
1443H- 2022**

Abstract

Cancer is considered one of the prominent reasons of death among mankind. cancer is categorized as a multi-factor disorder initiated by the dysregulation of different genes in the human body, which raise the demand to find specific medications that function by pointing definite signaling mechanisms. Various mechanisms, including genetic alterations, epigenetic alterations, and ubiquitination, can lead to the progression of carcinogenesis. Epigenetic mechanisms such as DNA methylation, post-translational histone changes, and non-coding RNA. Epigenetic silencing of tumor suppressor genes (TSGs) is thought to be one of the main pathways of the mechanism for stimulating tumor initiation and progression. Because of their reversibility, epigenetic modifications have attracted attention as interesting targets in cancer prevention and treatment. The epigenetic reader UHRF1 (ubiquitin-like containing plant homeodomain (PHD) and an interesting new gene (RING), finger domains 1) is highly expressed in various types of cancer and involved in the activity of epigenetic silencing of many TSGs via different pathways like; histone deacetylation and DNA methylation which encourage cell proliferation and suppress apoptosis.

UHRF1 has five function domains that enable it to bind to several other epigenetic players such as DNMT1 (DNA methyltransferase 1), HDAC1 (histone deacetylase 1), Tip60 (histone acetyltransferase), the histone methyltransferase G9a and HAUSP (herpes virus-associated ubiquitin-specific protease). UHRF1 can connect DNA methylation to histone epigenetic marks and accordingly ensure transferring them to the next generation throughout cell division. On the other hand, UHRF1 has been shown to be regulated by several pathways including tumor suppressor gene p73 and the deubiquitinase HAUSP. Indeed, low expression levels of p73 and overexpression of HAUSP are considered as main causes of the high expression levels of UHRF1. p73 expression is downregulated in various malignant tumors with p53 mutations by multiple mechanisms including the ubiquitination pathway. Therefore, studying and understanding the ubiquitin-proteasome signaling pathway in p73 regulation will help to identify this signaling pathway and find a talented new therapeutic strategy to fight cancer. A panel of E3 ubiquitin ligase enzymes is involved in the regulation of p73 expression in cancer cells with p53 mutation, such as the human promyelocytic leukemia (HL60) cells, human acute lymphoblastic leukemia Jurkat cells, and the human triple-negative breast cancer (MDA-MB-468) cells. The herpes virus-associated ubiquitin-specific protease (HAUSP) known as USP7 was shown to protect several RING-finger E3-ubiquitin ligases, such as Mdm2, ICP0, Chfr, and UHRF1, from autoubiquitination. Indeed, HAUSP belongs to the Epigenetic Code Replication Machinery 'ECREM' complex that also contains numerous epigenetic participants,

such as UHRF1, HDAC1, DNMT1, G9a as well as TIP60. Because of its deubiquitinase specialty and capability to bind directly to the other epigenetic regulators in the ECREM complex, HAUSP allocates itself at the top of the regulatory list.

My study aimed to understand the regulatory mechanisms involved in the regulation of both the tumor suppressor gene p73 and the deubiquitinase HAUSP and to find new inhibitors able to target specifically these two signaling pathways and by the consequence of UHRF1. Thymoquinone (TQ), is the main active ingredient found in black seed oil sourced from *Nigella Sativa*. TQ was shown to downregulate UHRF1 in leukemia cells through an unknown mechanism involving the upregulation of p73 and the downregulation of HAUSP.

RNA-seq data showed that several E3 ubiquitin-ligase enzymes, to be involved in the degradation of p73 including Itch, Pirh2, E3s Pin2, Mdm2, TRIM32, and SCFFBXO45 were downregulated in Jurkat cells in response to TQ. Among the target genes, Itch was significantly downregulated in TQ-treated Jurkat cells as compared with control cells. TQ-induced Itch downregulation was confirmed by real-time RT-PCR in Jurkat cells, MDA-MB-468 cells, and HL60. Treating Jurkat cells with either TQ or the proteasome inhibitor MG132 induced upregulation of p73 indicating that TQ could be a promising inhibitor of the E3-ubiquitin ligase Itch leading to the upregulation of tumor suppressor p73 in cancers expressing mutant p53.

The data from RNA sequencing showed that TQ induced an important decrease in the illustration of HAUSP. UHRF1 was initiated by TQ to go through a fast ubiquitination process as an initial phase of UHRF1 degradation, followed by suppressing the cell proliferation. It's noticed that UHRF1 ubiquitination induced by TQ is accompanied by the downregulation of HAUSP.

Our findings also showed that the anticancer drug doxorubicin provoked a similar effect of TQ dose- and time-dependent, where doxorubicin decreased the expression of UHRF1 in cancer cells, but UHRF1 did not go through ubiquitination as noticed in response to treatment with TQ. Moreover, the expression of the oncogene Bcl-2 is reduced by the effect of TQ, but without triggering its ubiquitination, like UHRF1. Together, these findings indicate that a UHRF1 undergoes fast ubiquitination in response to TQ treatment, which is a vital event for its degradation, where it's not the same response to doxorubicin treatment. It seems like TQ is initiating UHRF1 ubiquitination, but not the Bcl-2 oncogene, thus recognizing UHRF1 as a specific target of TQ in fighting cancer.

Keywords: Cancer mechanisms; UHRF1; p73; ubiquitination; E3 ubiquitin-ligase enzymes; Itch; HAUSP; Thymoquinone.