

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИКИ



КРАВЧУК ІГОР ВАСИЛЬОВИЧ

УДК :577.2.575

**БЛОК-БІЛКОВІ ВЗАЄМОДІЇ PH ДОМЕНУ ТА СТРУКТУРНО-
ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ C2 ДОМЕНУ БІЛКА VSR ПРИ
PH'-ПОЗИТИВНИХ ЛЕЙКЕМІЯХ**

03.00.03 –молекулярна біологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2025

Дисертацією є рукопис.

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

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

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
член-кор. НАН України,
Мінченко Олександр Григорович
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
завідувач відділу молекулярної біології;

кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
Завелевич Михайло Петрович
Інститут експериментальної патології, онкології і
радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України,
відділ функціональної геноміки та прогресії раку.

Захист відбудеться 2 жовтня 2025 року о 10³⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного 150.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного 150).

Автореферат розіслано “ ” серпня 2025 року.

Вчений секретар
спеціалізованої ради
кандидат біологічних наук, с.н.с.



І.В.Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Відповідно до даних Національного канцер-реєстру України, в 2022 році злоякісні новоутворення лімфоїдної та кровотворної тканини склали понад 5% від загальної онкологічної захворюваності та 55% в структурі захворюваності серед вікової групи до 17 років. Найбільшу частку серед захворювань цієї групи становили лейкомії – 39,2%, при цьому 23,8% хворих на лейкомію не пережили року (Федоренко et al. 2024).

Хронічна мієлоїдна лейкомія (ХМЛ) залишається однією з найпоширеніших різновидів лейкомії. У випадку цього онкогематологічного захворювання ключовою подією для злоякісного перетворення є реципрокний обмін плечами між негомологічними 9 та 22 хромосомами. Ця хромосомна транслокація $t(9;22)(q34;q11)$ призводить до формування аномальної хромосоми, що дістала назву філадельфійська або Ph'-хромосома. На цій хромосомі відбувається злиття фрагменту гену *BCR*, що розміщується на 22 хромосомі, та привнесеного з частини 9 хромосоми фрагменту *ABL1* гену. Як наслідок формується гібридний ген *BCR-ABL1*, продуктом якого є білок BCR-ABL1, який запускає процес перетворення нормальних клітин у ракові. Слід зауважити, що відомі кілька різновидів такої перебудови, які відрізняються за місцем точок розриву в хромосомах та кодують різні за розміром гібридні білки. Найвідоміші варіанти BCR-ABL1 дістали позначення p190, p210 та p230. При цьому виявлена асоціація між конкретним варіантом гібридного білка та картиною захворювання. З ХМЛ пов'язаний p210 варіант BCR-ABL1, він є основним онкомаркером та мішенню для терапії при цьому типі захворювання. Більш короткий p190 різновид виявляють у до 30% випадках гострої лімфобластної лейкомії (ГЛЛ), а також 1-2% випадках ХМЛ, де його наявність асоціюється з підвищеним ризиком розвитку бластного кризу (Adnan-Awad et al. 2021; Awad et al. 2019). Найдовший p230 варіант пов'язують з випадками варіанта нейтрофільного ХМЛ, який є більш доброякісним за типовий ХМЛ (Pane et al. 1996). Основною відмінністю між цими білками є різний доменний склад BCR частини гібридного білка. Присутність чи відсутність в складі гібридного білка BCR-ABL1 тих чи інших доменів нормального BCR є базою для розуміння різниці між молекулярними процесами у нормі та патології.

Кіназна активність ABL1 частини гібридного білка BCR-ABL1 є мішенню для кількох поколінь інгібіторів, які застосовують в терапії ХМЛ. Проте відомий феномен набуття резистентності до цих препаратів свідчить про необхідність пошуку нових мішеней для ефективної терапії. Успішність такого пошуку має ґрунтуватись на розумінні молекулярних процесів в клітині, до яких залучається білок BCR-ABL1, в порівнянні з функціями нормального білка BCR.

Відштовхуючись від того факту, що різні форми онкобілка BCR-ABL1 відрізняються від нормального BCR, окрім наявності ABL1 фрагменту, також різним доменним складом, вивчення функцій доменів BCR є перспективним напрямком для розкриття механізмів онкогенезу спричиненого різним варіантами BCR-ABL1. PH та C2 домени білка BCR є тими доменами, які по різному представлені в складі p190, p210 та p230, а їх роль недостатньо

досліджена навіть для нормального BCR. Попередні дослідження у відділі молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України виявили потенційних кандидатів по взаємодії з PH доменом BCR, серед яких були білки FNBP1, SMC1A та HSPB1 (Miroshnychenko et al. 2010). Структура та функції C2 домену білка BCR є досі не дослідженими.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась в рамках бюджетних тем: «Роль Bcr-асоційованих білків у сигнальних шляхах при мієлопроліферативних захворюваннях» (номер державної реєстрації – 0108U008527, 2009-2013 рр.), «Роль різних форм білка Bcr-ABL1 в сигнальних шляхах та формування пухлинного фенотипу при мієлопроліферативних неоплазмах» (номер державної реєстрації – 0113U004305, 2014-2018 рр.), «Ендогенні чинники розвитку мієлопроліферативних пухлин та раку передміхурової залози» (номер державної реєстрації – 0119U100821, 2019-2023 рр.), «Особливості експресії генів, що обумовлюють розвиток та формування хіміорезистентності в мієлоїдних новоутвореннях» (номер державної реєстрації – 0123U102367, 2024-2028 рр.).

Мета та завдання дослідження. Метою даної дисертаційної роботи було встановлення взаємодії PH домену BCR з білками FNBP1, SMC1A, HSPB1, вивчення структурно-функціональних особливостей C2 домену BCR, а також розробка системи CRISPR-Cas9, спрямованої проти хромосомної перебудови. Для досягнення цієї мети було поставлено наступні завдання:

1. Провести біоінформатичне передбачення вторинної та третинної структури C2 домену білка BCR.
2. Створити генетичні конструкції для бактеріальної експресії та на їх основі отримати рекомбінантний C2 домен білка BCR. Методом кругового дихроїзму проаналізувати відповідність вторинної структури отриманого рекомбінантного C2 домену білка BCR структурі передбаченій біоінформатично.
3. Дослідити потенційне зв'язування C2 домену BCR з фосфоліпідами.
4. Встановити взаємодію між FNBP1 та PH домену BCR в умовах спільної експресії в еукаріотичних клітинах.
5. Створити генетичні конструкції для отримання рекомбінантних білків, які відповідають повнорозмірному білку FNBP1 і його N-кінцевому фрагменту, та вивчити їх безпосередню взаємодію з PH доменом BCR в умовах *in vitro*.
6. Дослідити колокалізацію білків BCR та FNBP1 в процесі фагоцитозу.
7. Встановити спільну локалізацію білків SMC1A та BCR.
8. Створити генетичну конструкцію для бактеріальної експресії білка HSPB1 для вивчення його взаємодії з PH доменом білка BCR
9. Провести біоінформатичний пошук сайтів фосфорилування білків FNBP1, SMC1A та HSPB1 для оцінки можливої ролі кіназної активності BCR-ABL1 у їх регуляції.

10. Розробити генетичні конструкції для системи CRISPR-Cas9, націлених проти розриву хромосомної транслокації t(9;22) в клітинах K562.

Об'єкт дослідження. Об'єктом дослідження є гібридний білок BCR-ABL1, нормальний білок BCR та домени цього білка PH та C2.

Предмет дослідження. Предметом дослідження є роль C2 та PH доменів у роботі нормального білка BCR та гібридного онкобілка BCR-ABL1 в клітинних процесах.

Методи дослідження. Полімеразна ланцюгова реакція, клонування фрагментів ДНК для створення генетичних конструкцій, трансформація бактерій, бактеріальна експресія у клітинах *E. coli*, очищення рекомбінантних білків за допомогою афінної хроматографії, культивування культур еукаріотичних клітин, трансфекція еукаріотичних клітин, електрофорез білків у поліакриламідному гелі, вестерн-блот аналіз, пулдаун аналіз, far-вестерн-блот аналіз, коїмунопреципітація, біоінформатичний аналіз структури білка, метод кругового дихроїзму, біоінформатичний аналіз даних секвенування наступного покоління, імунофлуоресцентний аналіз, флуоресцентна і конфокальна мікроскопія, кількісний аналіз зображень тощо.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше було отримано рекомбінантний C2 домен білка BCR, відповідність вторинної структури якого була підтверджена методом кругового дихроїзму. Завдяки йому було встановлено взаємодію C2 домену білка BCR з вісьмома різними фосфоліпідами. Вперше було показано взаємодію білка FNBP1 з PH доменом білка BCR шляхом коїмунопреципітації та в умовах *in vitro*. Додатково підтверджено, що участь у безпосередній взаємодії з PH доменом бере саме N-кінцева ділянка FNBP1. Продемонстровано співлокалізацію білка FNBP1 з BCR при фагоцитозі. Виявлена колокалізація білка SMC1A з білком BCR. Створені генетичні конструкції для бактеріальної експресії білка HSPB1 та для системи CRISPR-Cas9 спрямованої на місце розриву при хромосомній транслокації.

Практичне значення одержаних результатів. Вивчені структурно-функціональні особливості C2 домену дозволять розкрити деталі функціонування білка BCR. Наприклад, виявлена взаємодія C2 домену з фосфоліпідами вказує на специфічні мембранні структури клітини, куди може бути рекрутований білок, що містить даний домен. Рекомбінантний C2 домен білка BCR може бути використаний у майбутніх дослідженнях тривимірної структури цього домену, що є важливою основою для розуміння його функціонування. Встановлена взаємодія PH домену з білком FNBP1, а також колокалізація BCR з FNBP1 та SMC1A дають прямий вихід на клітинні процеси, до яких можуть залучатись BCR та BCR-ABL1. Подальше розкриття механізмів цих взаємодій окрім фундаментального значення може мати і практичне застосування для пошуку нових точок впливу на процеси в лейкемічних клітинах. Розроблений підхід у створенні рішень на базі системи CRISPR-Cas9 спрямованої проти хромосомних транслокацій. Завдяки чому було створено генетичні конструкції, які можна апробувати для редагування *BCR-ABL1* перебудови на моделі лейкемічних клітин та оцінки перспективності практичного застосування цього підходу для терапії Ph'-позитивних лейкемій.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно було проведено аналіз літератури на тему дисертації та створено план експериментальних досліджень. Всі дослідження, обробка та аналіз результатів виконано особисто дисертантом. Здобувач особисто використовував різні описані в цій роботі методи для створення необхідних генетичних конструкцій для бактеріальної експресії, отримання та виділення рекомбінантних білків, які використовувались в дослідженні. Експерименти зі встановлення взаємодії з білками та ліпідами також були сплановані та виконані автором самостійно. Дослідження колокалізації за допомогою конфокальної мікроскопії та аналіз отриманих зображень здійснювались самостійно, але із консультуванням з боку Антоненко С.В. та Гур'янова Д.С. Автор щиро вдячний Р. Ніколаєву за допомогу з проведенням досліджень методом кругового дихроїзму. Здобувач дякує Антоненко С.В., Гур'янову Д.С., Малюті О.В., Лисецькій Т.Ю. за важливі взаємопідтримку, обмін досвідом та творчу атмосферу, що сприяли подоланню труднощів на різних етапах роботи. Автор висловлює особливу подяку науковому керівнику Телегєєву Г.Д. за стратегічне керівництво дослідженнями, завдяки якому дана робота стала можливою.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були обговорені на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях: Фундаментальні та прикладні дослідження в біології (Україна, Донецьк, 2009), International Conference “Tumor and Host: Novel Aspects of Old Problem” (Україна, Київ, 2010), Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології (Україна, Київ; 2010), Conference XXXIII World Congress of the International Society of Hematology (Israel, Jerusalem, 2010), 5th Conference of IMBG Young Scientists, dedicated to O. O. Bogomolets 130th Anniversary (Україна, Київ, 2011), MolOnco2012 The 1st Multidisciplinary Symposium “Molecular Oncology: from Laboratory Bench to Medicine” (Україна, Київ, 2012), International Scientific conference “Normal and Cancer Stem Cells: Discovery, Diagnosis and Therapy” (Україна, Київ, 2017), FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference – Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine” (Україна, Київ, 2018), 22nd International Chromosome Conference (Czech Republic, Prague, 2018), BASEL LIFE Congress (Switzerland, Basel, 2018).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 20 наукових публікацій, з них 11 статей у фахових журналах (з них 3, які входять до четвертого квартилю Q4 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports) та 9 тез доповідей у збірках матеріалів вітчизняних і міжнародних наукових конференцій, з'їздів та конгресів.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 213 найменувань. Дисертацію викладено на 142 сторінках стандартного машинопису, вона містить 27 рисунків, 2 таблиці та 1 додаток.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи досліджень

Використані ферменти. Pfu полімераза (ThermoFisher Scientific, USA), ендонуклеази рестрикції BamHI, BglII, XhoI та BbsI (ThermoFisher Scientific, USA), T4 ДНК-полімераза (ThermoFisher Scientific, USA), T4 полінуклеотидкіназа (Promega, США). Реакційні буфери були від виробника ферментів.

Антитіла та барвники, використані в роботі. Кролячі антитіла проти гемаглютиніну (anti-НА, Н6908, Sigma-Aldrich, США), кролячі антитіла проти глутатіон-S-трансферази (anti-GST, G7781, Sigma-Aldrich, США), мишачі антитіла проти полігістидину (anti-His, Н1029, Sigma-Aldrich, США), мишачі моноклональні антитіла проти FNBP1 (sc-515414, Santa Cruz Biotechnology, США), кролячі поліклональні антитіла проти BCR (PA5-17709, ThermoFisher Scientific, США). Протикролячі антитіла кон'юговані з пероксидазою хрому (А6154, Sigma-Aldrich, США), антимишачі антитіла кон'юговані з пероксидазою хрому (AS003, ABclonal Technology, США), поліклональні антимишачі антитіла кон'юговані з DyLight™ 488 (SA234709, ThermoFisher Scientific, США), антикролячі антитіла з флуоресцентною міткою Alexa Fluor™ 647 (A-21244, ThermoFisher Scientific, США). DAPI (D9542, SigmaAldrich, США), пропідій йодид (P1304MP, Sigma Aldrich, США).

Вектори та генетичні конструкції. Генетичні конструкції pET32a-PH та pEGFP-PH було створено Д. Мірошниченко (ІМБіГ, Україна). Генетична конструкція, що кодує повнорозмірний p230 BCR-ABL1 була люб'язно надана N. Heisterkamp (Children's Hospital of Los Angeles, USA). Конструкція FBP17-pmCherryC1 був дарунком від Christien Merrifield (Addgene #27688). Вектори pJ3H та pJ3H-FBP17, що кодує повнорозмірний FNBP1, були подаровані Pontus Aspenstrom, Каролінгський інститут, Швеція. Вектор pOTB7-Hsp27 був люб'язно наданий Анною Дубровською, Німеччина. Вектори pET-28c-sumo, pET-42a, pGEX-4T-1 та pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) використовувались як базові вектори для створення генетичних конструкцій.

Штами E. coli, що використовувались в роботі. NEB Turbo: F' proA⁺B⁺ lacI^q ΔlacZM15 fhuA2 Δ(lac-proAB) glnV galK16 galE15 R(zgb-210::Tn10)Tet^S endA1 thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5. TOP10: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80 lacZΔM15Δ lacX74 recA1 araΔ139Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG. Rosetta(DE3)pLysS: F- ompT hsdSB(rB⁻, mB⁻) gal dcm (DE3) pLysSRARE (Cam^R). Штам ArcticExpress(DE3), який походить від BL21(DE3) та адаптований для експресії та синтезу білка при низьких температурах.

Методи створення генетичних конструкцій. Для створення pET28-C2, що кодує C2 домен BCR, використовували праймери C2E-F 5'-CGCAACGGCAAGAGTTACAC-3' та C2E-R 5'-GATGTAGGGCACCTTGG-3' для першого раунду ПЛР, а також C2-F 5'-GAAGTCTACCAGGAACAACCGGTGG-ATCCATGGATGATGAGTCTCCGGGGCTC-3' та C2-R 5'-GATCTCAGTGGT-GGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTTACTCCCTGCTGTTGAACTTGAC-3' для

другого раунду. Далі використовували метод незалежного від послідовності та лігування клонування. Для отримання рGEX-4T-FNBP1 ДНК фрагмент, що кодує повнорозмірний FNBP1, отримували шляхом рестрикції FBP17-pmCherryC1 та лігували з вектором рGEX-4T-1. При створенні рGEX-4T-FNBP1-N для отримання фрагменту, який кодує N-кінцевий фрагмент FNBP1, використовували ампліфікацію з праймерами N-FNBP1-F 5'-CATGAGCTGGGGCACCCGAG-3' та N-FNBP1-R 5'-GTGCGCTTCATTGGCTGAGTG-3'. Продукт ампліфікації лігували з рGEX-4T-1. Під час створення рЕТ-42-HSPB1 проводили ПЛР з праймерами Н-f 5'-TATAGGATCCGAGTCAGCCAGCATGACC-3' та Н-r 5'-TATAGAATTCTTACTTGGCGGCAGTCTC-3', щоб отримати цільову послідовність, що кодує повнорозмірний HSPB1. Генетичні конструкції для CRISPR-Cas9 системи створювали на основі вектора рSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) методом Golden Gate збірки.

Отримання рекомбінантних білків. Для бактеріальної експресії генетичної конструкції рЕТ28-C2 використовували ArcticExpress (DE3), для інших (рGEX-4T-FNBP1, рЕТ32a-PH, рGEX-4T-FNBP1-N, рЕТ-42-HSPB1) застосовували штам Rosetta(DE3)pLysS. Білки, що містили полігістидинову мітку очищали за допомогою HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Millipore, США). Білки, що містили глутатіон-S-трансферазну мітку очищали за допомогою глутатіон-сефарози 4В (SigmaAldrich, США)

Круговий дихроїзм. Концентрація білка становила 17,73 мікромоль/л. Використовували спектрополяриметр J-810 (JASCO) з кварцевою кюветою діаметром 1 см. Сімдесят одна точка даних була зареєстрована при +37°C від 260 до 190 нм з кроком даних 1 нм, інтервалом даних – 1 нм, швидкістю сканування – 100 нм/хв. З отриманого спектру віднімали еталонний спектр буфера. Виявлену еліптичність було перераховано як дельта епсилон.

Аналіз зв'язування з фосфоліпідами. Для ідентифікації ліпідів, які можуть взаємодіяти з С2 доменом BCR, використовували мембранну смужку з нанесеними ліпідами PIP Strip P-6001, (Echelon Biosciences). Застосовували протокол виробника.

Культури еукаріотичних клітин. У роботі було використано клітинні лінії K562, 293Т та J774, які культивували згідно рекомендацій Американського банку культур клітин та тканин (ATCC).

Трансфекція клітин ссавців. Трансфекція клітин 293Т здійснювалася за допомогою TurboFect Transfection Reagent (ThermoFisher Scientific, США) за рекомендаціями виробника.

Конфокальна мікроскопія. Після культивації еукаріотичні клітини фіксували 4% розчином формальдегіду. Пермеабілізували розчином Triton X-100. Блокували 1% бичачим сироватковим альбуміном. Потім клітини інкубували із специфічними первинними антитілами у відповідному розведенні, промивали та додавали відповідні мічені флуоресцентною міткою вторинні антитіла. Фарбування ядер проводили за допомогою DAPI (ThermoFisher Scientific, США). Препарат на скельцях полімеризували з використанням CitiFluor™ AF1, Mounting Medium (Science Services, Німеччина). Мікропрепарати вивчали за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопу Zeiss LSM 510

Meta (Німеччина), з масляним об'єктивом 100x1.25 N.A та програмою «LSM Browser», або лазерного скануючого конфокального мікроскопу Leica SP8 (Німеччина) з використанням масляним об'єктивом 90° з апертурою 1,3. Аналіз колокалізації білків здійснювали за допомогою програмного забезпечення Fiji ImageJ, плагіна JACoP з урахуванням коефіцієнта кореляції Пірсона та коефіцієнта колокалізації Мандерса

Біоінформатичні інструменти використані в роботі. Вторинну структуру білків передбачали за допомогою Psipred 4.0 та S4pred (<https://bioinf.cs.ucl.ac.uk>). Для третинної структури використовували DMPfold 2.0. Властивості зв'язування з металами оцінювались за допомогою DMPmetal. Третинні структури візуалізували та аналізували за допомогою iCn3D Structure Viewer 3.40.2 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/icn3d>). Аналіз даних кругового дихроїзму проводився на сервері BeStSel v1.3.230210 (<https://bestsel.elte.hu>). Для аналізу сайтів фосфорилування білків застосовували бази PhosphoSitePlus, Phospho.ELM, а також Group-based Prediction System (GPS) 6.0. Для аналізу даних секвенування наступного покоління використовували SAMtools, BWA, Breakdancer, Integrative Genomics Viewer (IGV) версії 2.19.4.

Результати досліджень та їх обговорення

Моделювання вторинної та третинної структури C2 домену білка BCR. На поліпептидній послідовності BCR межі C2 домену у різних публічних базах даних визначені по-різному. Станом на січень 2025 року в базі UniProt домен C2 визначається як послідовність амінокислот в позиціях від 893 до 1020, тоді як ресурси NCBI описують його як діапазон від 913 до 1033 а.з. Інструменти Psipred і S4pred показали, що амінокислотна послідовність, заснована на версії анотації NCBI, з більшою ймовірністю дає вторинну структуру типову для доменів C2. Вісім надійних бета-ланцюгів, довжина яких перевищує три амінокислоти, було передбачено для цього варіанту домену C2. Версія NCBI домену C2 була взята як основа, але була розширена з позиції 913 до позиції 903. Це зроблено для того, щоб отримати потенційно довший перший бета-ланцюг, який був би розрізаний без цієї корекції (рис. 1).

Для передбачення третинної структури використовували DMPfold 2.0. Цей інструмент створює .pdb-файл передбаченої структури. Результат порівнювався з вибраною областю (903-1037aa) з передбачення повної структури білка BCR з бази даних структури білка AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P11274>). Загалом ці дві методики показали структуру, близьку до типових доменів C2. Для доменів C2 інших білків було описано два типи можливих топологій на основі їх різниці в перестановці бета-ланцюгів. Згідно з передбаченнями третинної структури, C2 домен BCR може належати до II типу топології.

Послідовність білка BCR з 903-1037 а.з. була обрана як та, що відповідає C2 домену. Тому на наступних етапах роботи над отриманням ізольованого C2 домену в рекомбінантній формі саме вона була взята за основу.

Отримання рекомбінантного C2 домену білка BCR та валідація його структури за допомогою кругового дихроїзму. На базі вектора pET-28c-sumo

кругового дихроїзму свідчать про те, що рекомбінантний білок мав вміст вторинної структури, подібний до того, що можна очікувати від домену С2.

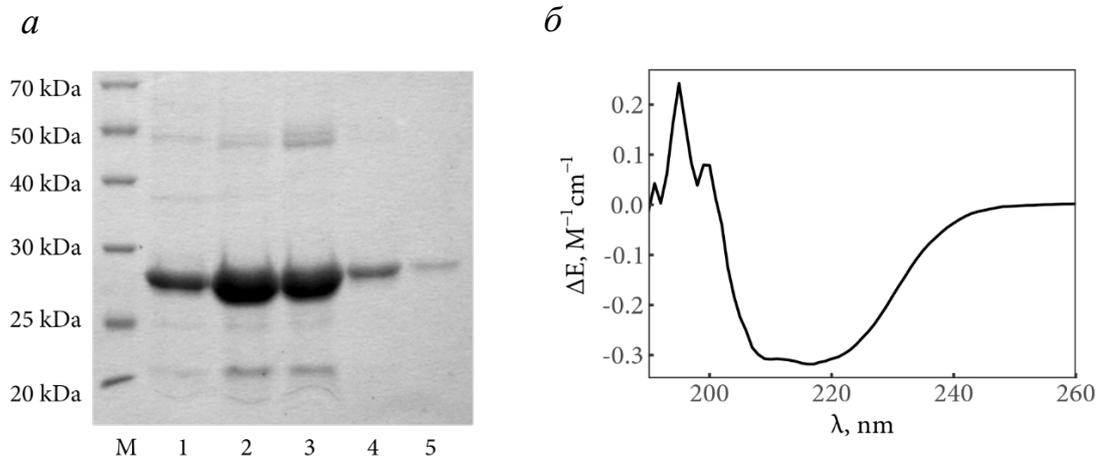


Рис. 2. а - Очищений рекомбінантний С2 домен білка BCR: 1-5 – стадії елюції, М – маркер молекулярної ваги PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA); б - Спектр кругового дихроїзму рекомбінантного С2 домену білка BCR

Взаємодія рекомбінантного С2 домену білка BCR з фосфоліпідами. Завдяки інкубуванню рекомбінантного домену С2 білка BCR разом з мембраною, що містила різні фосфоліпіди, було виявлено його здатність зв'язувати деякі з них (рис. 3). Серед ліпідів, які взаємодіяли з доменом С2, були: фосфатидилінозитол-3-фосфат (PI(3)P), фосфатидилінозитол-4-фосфат (PI(4)P), фосфатидилінозитол-5-фосфат (PI(5)P), фосфатидилінозитол-3,4-біфосфат (PI(3,4)P₂), фосфатидилінозитол-3,5-біфосфат (PI(3,5)P₂), фосфатидилінозитол-4,5-біфосфат (PI(4,5)P₂), фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфат (PI(3,4,5)P₃) і фосфатидилсерин (PS). Розуміння з якими саме ліпідами специфічно взаємодіє С2 домен може вказати на можливу локалізацію білка, що має в своєму складі такий домен.

Для багатьох С2 доменів також показана взаємодія з іонами кальцію, що може регулювати зв'язування з фосфоліпідами. Часто кальцій при цьому є посередником зв'язування за рахунок електростатичних взаємодій. Проте відомі і С2 домени, що є кальцій-незалежними. Проведені в цій роботі дослідження зв'язування з ліпідами не дають відповідь щодо ролі кальцію, оскільки спеціально іони Ca²⁺ не додавались у буфер, що використовувався, проте не вживали і додаткових заходів, щоб прибрати можливу контамінацію іонами Ca²⁺. Для добре вивчених доменів С2 зв'язування Ca²⁺ часто пов'язане з петлями між бета-ланцюгами. На основі передбачень вторинної та третинної структур ми можемо приблизно оцінити послідовності амінокислот, які припадають на ці петлі. Завдяки прогнозуванню зв'язування іонів металів за допомогою DMPmetal було виявлено можливе зв'язування металу в полярному Asn 928 (Р-значення: 0,16) і негативно зарядженому Glu 978 (Р-значення: 0,10). Ці залишки розташовані в передбачених петлях. Водночас у аналізуючи саму послідовність

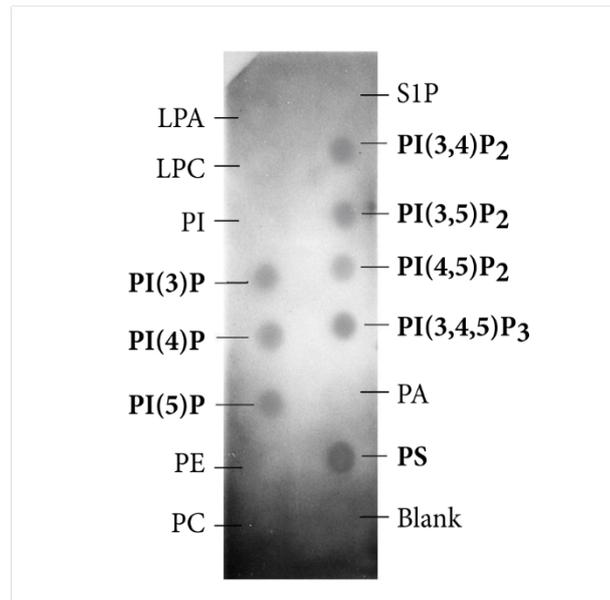


Рис 3. Зв'язування фосфоліпідів рекомбінантного C2 домену білка BCR. LPA - лізофосфатидна кислота, LPC - ліпофосфохолін, PI - фосфатидилінозитол, PI(3)P - фосфатидилінозитол-3-фосфат, PI(4)P - фосфатидилінозитол-4-фосфат, PI(5)P - фосфатидилінозитол-5-фосфат, PE - фосфатидилетаноламін, PC - фосфотидилхолін, S1P - сфінгозин-1-фосфат, PI(3,4)P₂ - фосфатидилінозитол-3,4-біфосфат, PI(3,5)P₂ - фосфатидилінозитол-3,5-біфосфат, PI(4,5)P₂ - фосфатидилінозитол-4,5-біфосфат, PI(3,4,5)P₃ - фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфат, PA - фосфатидна кислота, PS - фосфатидилсерин. Жирним шрифтом відмічені фосфоліпіди, які взаємодіяли з C2 доменом

можна виявити позитивно заряджені залишки (Lys 924, Lys 979, Lys 983, 983, Lys 985, Lys 988, Arg 996) і кілька негативно заряджених (Glu 989, Asp 990, Glu 992, Asp 995). З цього аналізу послідовності ми не можемо з упевненістю зробити висновки щодо зв'язування кальцію та механізму зв'язування ліпідів. Для цього необхідні додаткові експериментальні підтвердження.

Аналіз сайтів фосфорилування білків FNBP1, SMC1A та HSPB1. Оскільки BCR є серин-треонін-кіназою, а ABL1 – тирозин-кіназою, то потрібно було оцінити потенційну роль цих кіназних активностей на функціонуванні білків-кандидатів по взаємодії з PH доменом білка BCR (FNBP1, SMC1A та HSPB1). Для білка FNBP1, завдяки інструменту Group-based Prediction System (GPS) 6.0, було передбачено 2 можливі сайти фосфорилування BCR (S296, S349) та 3 сайти для фосфорилування ABL1 (Y67, Y287, Y500). Для SMC1A виявлено лише 3 потенційні сайти для фосфорилування ABL1 кіназою (Y511, Y600, Y1085). Для білка HSPB1 було передбачено 1 можливий сайт для серин/треонінкінази BCR в положенні S199 та потенційні 2 сайти (Y54 та Y142) для тирозин-кінази ABL1.

Білок-білкова взаємодія між BCR та FNBP1. Для встановлення взаємодії білка FNBP1 з PH доменом білка BCR застосовувались різні методи. Зокрема досліджували коімунопреципітацію PH домену білка BCR з повнорозмірним FNBP1 в клітинах 293T. Клітини 293T були трансфіковані pJ3H-FNBP1 та

pEGFP-PH, а також порожнім рJ3H та рEGFP-PH. Клітини лізували та додавали до сефарози G, яка заздалегідь була насичена антитілами проти гемаглютиніну anti-НА. Ці антитіла зв'язували білки, які були продуктами векторів рJ3H-FNBP1 та порожнього рJ3H. Разом з білком FNBP1, який експресувався в клітинах з міткою НА, на сефарозі коімунопреципітували ті білки, які були здатні взаємодіяти з ним. Вестерн-блот аналіз з антитілами проти GFP дозволив ідентифікувати досліджуваний нами PH домен серед білків, які зв'язувались білком FNBP1 за даних умов (рис. 4). Таким чином було показано взаємодію між повнорозмірним білком FNBP1 та PH доменом білка VCR. Важливо розуміти, що цей метод не дозволяє стверджувати, що мала місце безпосередня взаємодія між досліджуваними білками адже вони знаходяться в присутності багатьох інших білків клітини.

Для того, щоб продемонструвати безпосередню взаємодію між FNBP1 та PH доменом було вирішено провести дослідження взаємодії в умовах *in vitro*. Для цього було успішно створено генетичну конструкцію рGEX-4T-FNBP1. З нею проводили бактеріальну експресію в *E. coli* штаму Rosetta(DE3)pLysS та отримували синтез рекомбінантного білка. Оскільки даний рекомбінантний білок містив додатково глутатіон-S-трансферазу (GST-мітка), то для його очищення використовували глутатіон-сефарозу 4В. Очищений та зв'язаний з глутатіон-сефарозою 4В білок FNBP1 застосовували безпосередньо для пулдауну. Таким самим способом за допомогою порожнього вектора рGEX-4T-1 отримували глутатіон-сефарозу 4В, на якій розміщений білок, який відповідав одній GST мітці. Його використовували для перевірки відсутності зв'язування між рекомбінантним PH та GST-фрагментом. Рекомбінантний PH домен отримували шляхом експресії рЕТ32а-PH в Rosetta(DE3)pLysS. Оскільки даний білок містив полігістидинову мітку, його очищали за допомогою афінної хроматографії з носієм Ni²⁺. Очищений рекомбінантний PH інкубували з глутатіон-сефарозою 4В,

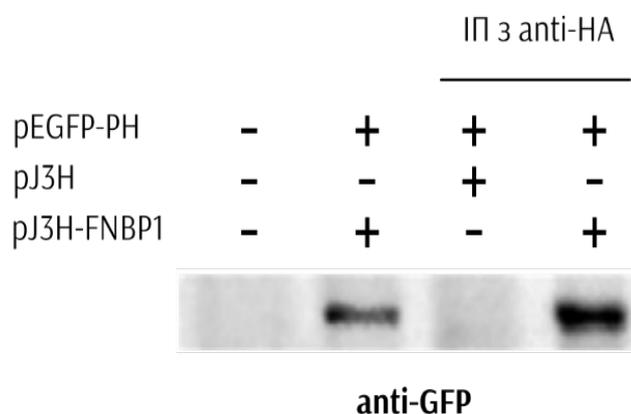


Рис. 4. Коімунопреципітація PH домену VCR разом з повнорозмірним FNBP1 в клітинах 293Т

на якій був присутній повнорозмірний FNBP1, а також в якості контролю з сефарозою, яка містила чистий GST білок. Результати пулдауну аналізували за допомогою вестерн-блоту (рис. 5). За допомогою антитіл проти гістидину виявлено наявність PH домену у результатах пулдауну з FNBP1 та відсутність PH домену у результатах пулдауну з GST. Таким чином було встановлено, що PH домен білка BCR прямо взаємодіє з повнорозмірним FNBP1 та не взаємодіє з GST міткою.

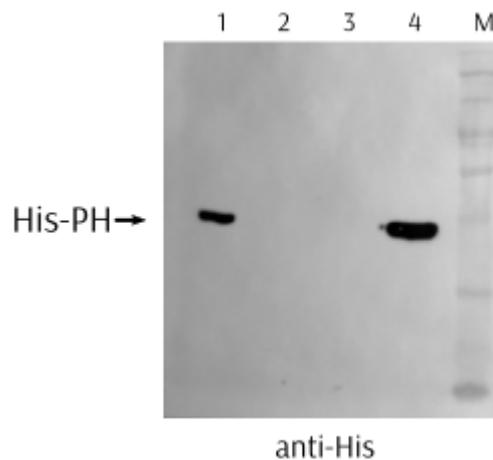


Рис. 5. Вестерн-блот аналіз результатів GST-пулдауну рекомбінантного PH домену BCR, міченого гістидином, з FNBP1, міченого GST. 1 – фракція елюції His-міченого PH домену BCR; 2 – загальний лізат Rosetta(DE3)pLysS, в яких була експресія рекомбінантного GST-FNBP1; 3 – результат пулдауну PH з білком GST, зв'язаним з глутатіон-сефарозою 4В (негативний контроль); 4 – результат пулдауну PH з GST-FNBP1, зв'язаним з з глутатіон-сефарозою 4В; М – маркер молекулярної ваги

Для ідентифікації тої частини FNBP1, яка може бути відповідальною за таку взаємодію, додатково було створено генетичну конструкцію pGEX-4T-FNBP1-N, яка кодувала лише N-кінцевий регіон цього білка. Очищений рекомбінантний фрагмент білка FNBP1 (розміром ~63кДа) взаємодіяв з PH доменом BCR, що було підтверджено методом far-вестерн блот аналізу (рис. 6). Фрагмент FNBP1, що використовувався, містив перші 293 амінокислотні залишки від повної поліпептидної послідовності. Ця частина включала у своєму складі F-BAR домен, що може відчувати зміни напруги клітинної мембрани в реальному часі, а також сприяє формуванню вигнутих мембранних структур. Отже було виявлено, що відповідальний за цю взаємодію з боку FNBP1 саме його N-термінальний кінець.

Колокалізація FNBP1 з білком BCR в процесі фагоцитозу. Для того, щоб доповнити дані щодо зв'язку між FNBP1 та BCR важливо було оцінити також цю взаємодію в контексті клітини, зокрема на прикладі процесів, в яких FNBP1 відіграє важливу роль. Одним з таких процесів є фагоцитоз, де білок FNBP1 необхідний для формування фагоцитарних чаш, які являють собою багаті на актин мембранні структури, що поглинають сторонні частинки. Для цього використовували культуру макрофагів J774, до яких додавали вбиті і попередньо

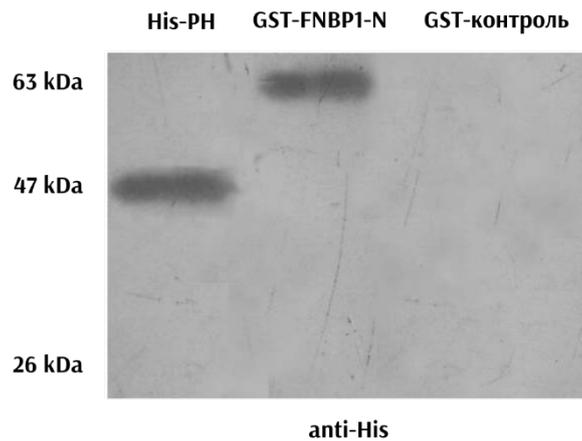


Рис. 6. Результати far-Вестерн-аналізу. Наявність сигналу в районі 63 кДа вказує на те, що N-фрагмент FNBP1 зв'язав PH домен BCR. Сигнал в зоні 47 кДа – контроль антитіл anti-His. Відсутність сигналу в GST-контролі свідчить про те, що виявлене зв'язування не за рахунок GST

пофарбовані пропідій йодидом клітини дріжджів, що служили об'єктом для фагоцитозу. Це дозволяло отримати чітку картину утворених достатньо великих фагосом з дріжджовими клітинами всередині, які були зручними для мікроскопічного спостереження. Макрофаги на стадії сформованих фагосом фіксували та за допомогою антитіл специфічних до BCR та FNBP1 аналізували колокалізацію цих білків. За допомогою імуофлуоресцентного аналізу з подальшою конфокальною мікроскопією було продемонстровано, що FNBP1 локалізується в області поглинання клітин дріжджів під час фагоцитозу. Точки колокалізації між BCR та FNBP1 були виявлені у фагосомах клітин J774 шляхом накладання двох зображень (рис. 7). Було встановлено, що коефіцієнт кореляції Пірсона для колокалізації між білками BCR і FNBP1 у клітинах J774 становить $0,75 \pm 0,05$ ($n = 4$). Частка BCR, що перекривається з FNBP1 (коефіцієнт Мандерса M1), дорівнює $0,70 \pm 0,03$ ($n = 4$), а частка FNBP1, що перекривається з BCR (коефіцієнт Мандерса M2), становить $0,63 \pm 0,16$ ($n = 4$), що свідчить про високий рівень колокалізації білків BCR і FNBP1. Слід відзначити, що використані J774 є мишиними макрофагами, а тому співлокалізація була продемонстрована для мишиних білків BCR та FNBP1. Співпадіння між амінокислотними послідовностями людських FNBP1 і BCR та послідовностями їх мишиних аналогів становить 94%. Тобто ці білки є достатньо консервативними. Зокрема антитіла, які використовувались, були однаково специфічними як для людських, так і мишиних білків. А тому хоч і не можна остаточно стверджувати, що виявлена нами колокалізація має місце в людських макрофагах, але тим не менше вона є достатньо імовірною. В майбутньому апробований тут підхід може бути використаний і для людських макрофагів.

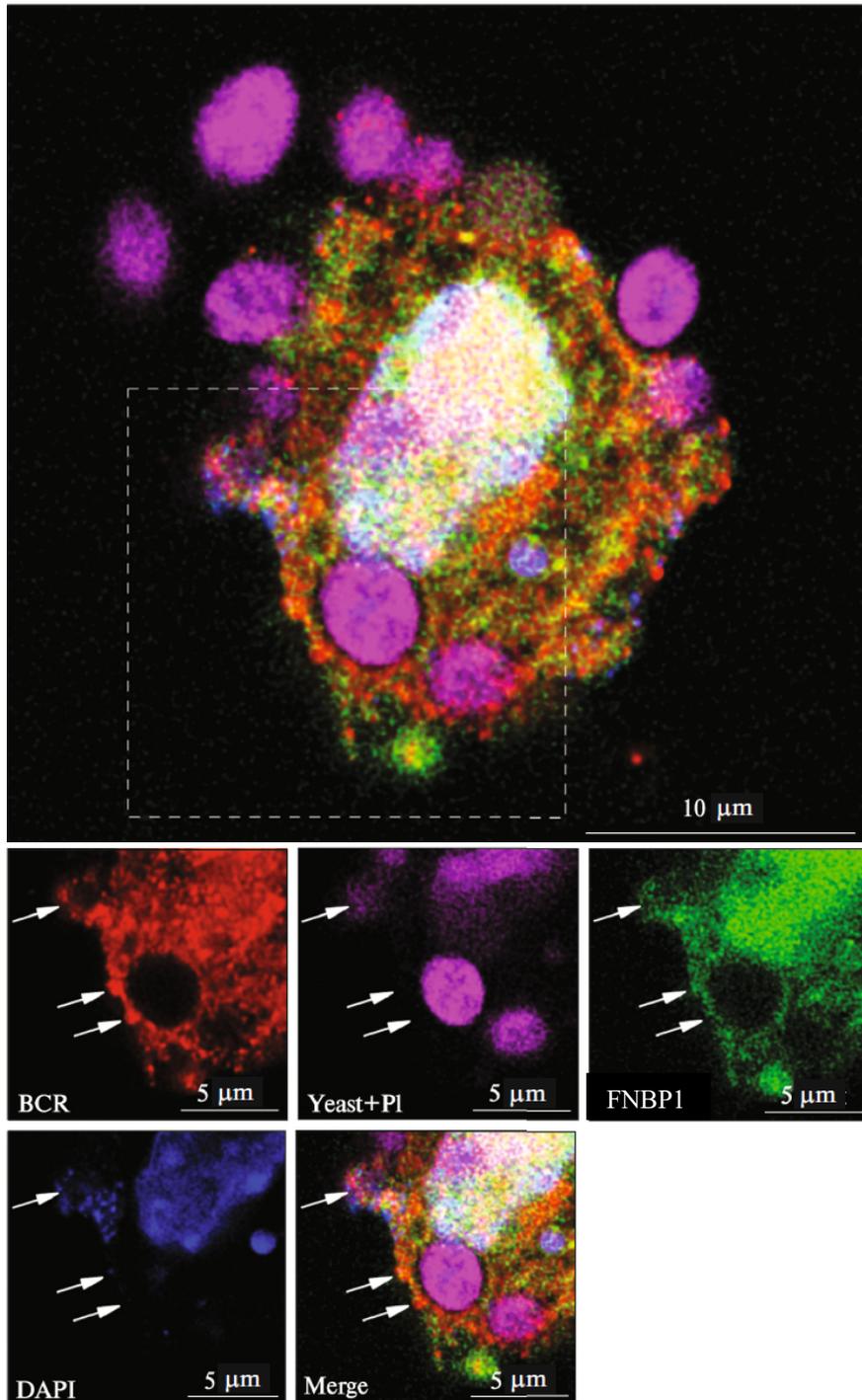


Рис. 7. Колокалізація білків BCR та FNBP1 під час фагоцитозу в клітинах J774. Імунофлуоресцентний аналіз із використанням антитіл до BCR (червоний колір) та FNBP1 (зелений колір), накладання сигналів локалізації білків (жовтий колір). Клітини дріжджів були забарвлені пропідій йодидом (фіолетовий колір). Для візуалізації ядер використовували флуоресцентний барвник DAPI (синій колір)

Колокалізація SMC1A з білком BCR. Попередні дослідження вже встановлювали взаємодію PH домену BCR з SMC1A методом пулдауну. В продовження цієї роботи нами було проведено дослідження колокалізації SMC1A та BCR в клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії K562. Це робили за допомогою

специфічних антитіл. Отримані за допомогою конфокального мікроскопа зображення використовували для аналізу колокалізації. Отримані зображення містили інформацію щодо інтенсивності флуоресценції з різних каналів детекції (зелений, червоний, синій) на 16-ти зрізах препарату у вертикальній площині. Червоний канал відповідав флуоресценції антитіл проти BCR. Особливістю клітин K562 є те, що вони походять від людини з ХМЛ та мають перебудову BCR-ABL1. Тому антитіла проти BCR детектували не тільки нормальний BCR, а і гібридний BCR-ABL1 білок. Зелений канал відповідав флуоресцентному сигналу отриманому від антитіл проти SMC1A. Крім цього для візуалізації ДНК в ядрах використовували DAPI, що давав флуоресцентний сигнал на синьому каналі. Загалом було виявлено окремі регіони в клітині, для яких достовірно реєструвалась співлокалізація досліджуваних білків (рис. 8). Коефіцієнт кореляції Пірсона становив $r=0.703$, коефіцієнти Мандерса становили $M1=0,493$ та $M2=0,199$ для червоного і зеленого каналів відповідно. Цікавим було б в майбутніх дослідженнях окремо розвинути питання щодо колокалізації цих білків на різних стадіях поділу клітини, що може потенційно впливати на зустріч цих білків.

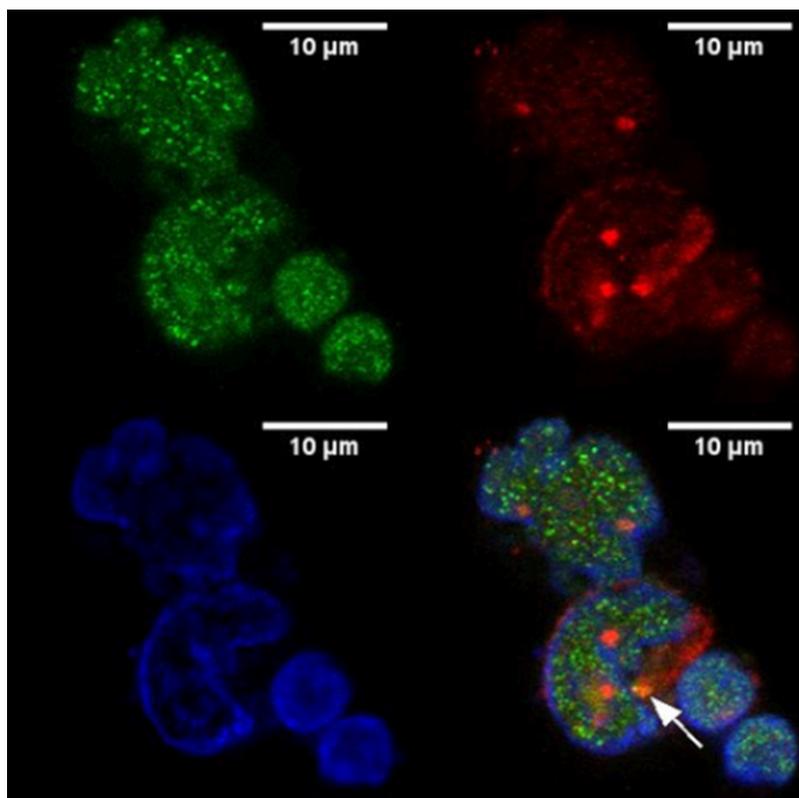


Рис. 8. Вивчення можливої колокалізації білків BCR та/або BCR-ABL1 з білком SMC1A в клітинах K562 (зріз 11). Імунофлуоресцентний аналіз із використанням антитіл до BCR (червоний колір) та SMC1A (зелений колір). Для візуалізації ядер використовували флуоресцентний барвник DAPI (синій колір). Стрілкою позначена ділянка візуальної колокалізації

Створення генетичної конструкції pET-42-HSPB1 та її експресія. На основі вектора pET-42a було створено генетичну конструкцію, що кодувала білок HSPB1. Отриману генетичну конструкцію pET-42-HSPB1 експресували в штамі

Rosetta(DE3)pLysS. Було отримано видиму смугу синтезованого рекомбінантного білка очікуваного розміру близько 55 кДа. Проте для даного білка ще необхідна оптимізація умов експресії та очищення на глутатіон-сефарозі 4В. Лише коли буде отримано очищений у достатній кількості можна буде продовжити дослідження взаємодії з РН доменом BCR.

Створення конструкції CRISPR-Cas9 націленої на точку розриву хромосомної транслокації. Особливістю регіону злиття генів при хромосомній транслокації є те, що він лежить у інтронній області. Тому сама послідовність може бути унікальною для лейкомічних клітин конкретного хворого і відрізнятися від такої у іншого хворого, навіть якщо на рівні мРНК та білка BCR-ABL1 все буде однаковим. Оскільки систему CRISPR-Cas9 потрібно було спрямовувати на саме ці регіони злиття на рівні геному, то важливим для вибору мішені було знання безпосередньої послідовності в цій інтронній області у лейкомічних клітинах, на яких планувалось застосовувати цю технологію. Моделлю, на якій було вирішено тестувати CRISPR-Cas9, були обрані культура клітини K562, що мають перебудову BCR-ABL1. Тому використовували дані геномного секвенування наступного покоління отримані з K562 для встановлення потрібної нуклеотидної послідовності злиття генів. Готового рішення для такого аналізу не існувало, то використовували комбінацію різних програмних інструментів для роботи з даними секвенування наступного покоління. Завдяки аналізу було встановлену первинну нуклеотидну послідовність проти якої відбувався дизайн олігонуклеотидів, які використовували для створення

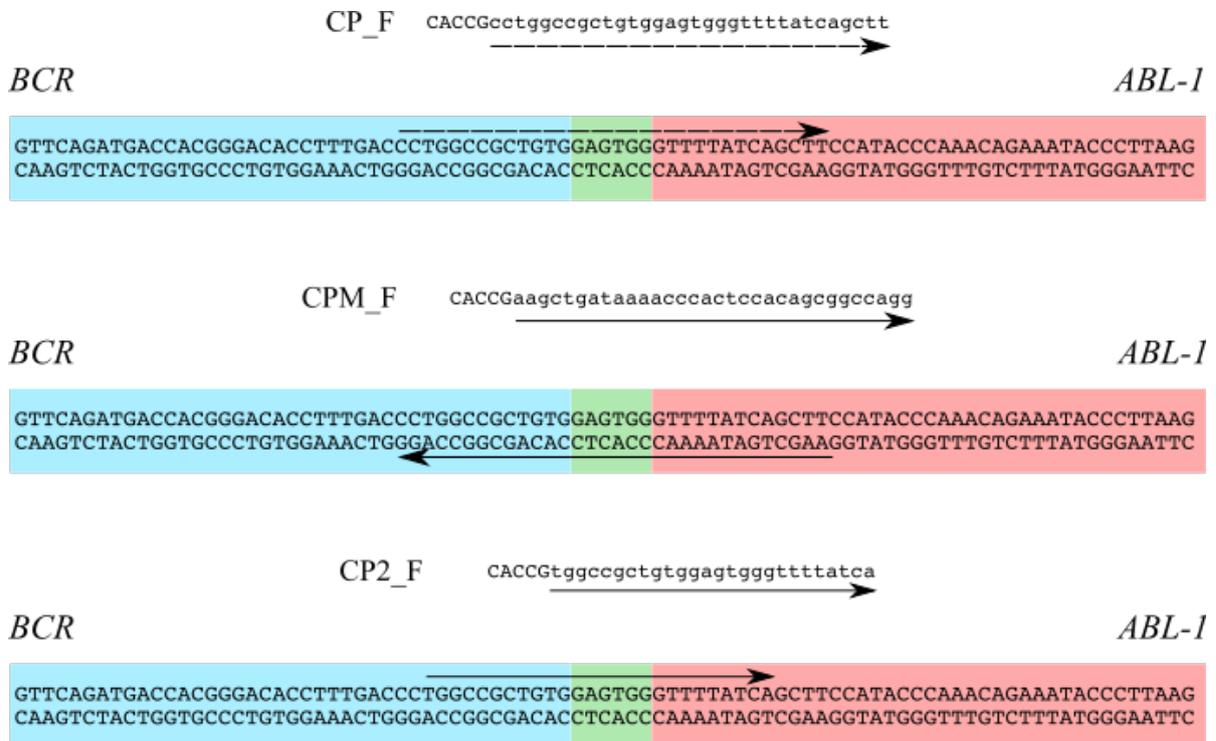


Рис. 9. Нуклеотидна послідовність злиття генів *BCR* та *ABL1* в геномі клітин K562 з підібраними олігонуклотидами

генетичних конструкцій для випробування CRISPR-Cas9 на обраних клітинах K562 (рис. 9). Такі конструкції були успішно створені для майбутніх досліджень.

ВИСНОВКИ

Вивчення структурно-функціональних особливостей C2 домену та білок-білкових взаємодій PH домену білка BCR дозволяє наблизитись до розуміння процесів, які відбуваються в клітинах при Ph'-позитивних лейкеміях, а також потенційно можуть дозволити виявити нові мішені для терапії. У роботі було отримано рекомбінантний C2 домен, який дозволяє вивчати його структуру та функції. Було встановлено взаємодію PH домену білка BCR з FNBP1 та показано колокалізацію з FNBP1 та SMC1A. Створено генетичні конструкції для бактеріальної експресії білка HSPB1 та для CRISPR-Cas9 системи націленої на хромосомні перебудови, ці конструкції можуть бути використані для майбутніх досліджень.

1. Біоінформатичне прогнозування вторинної та третинної структури домену C2 білка BCR показало, що домен C2 BCR відповідає відомим C2 доменам інших білків, а саме є бета-сендвічем з топологією типу II.
2. Створено генетичну конструкцію для бактеріальної експресії, за допомогою якої отримано очищений рекомбінантний C2 домен білка BCR. Дані щодо кругового дихроїзму рекомбінантного домену C2 білка BCR підтвердили очікувану вторинну структуру з переважанням бета-складок.
3. Виявлено зв'язування рекомбінантного домену C2 з вісьмома різними фосфоліпідами. Роль іонів кальцію у цьому процесі потребує подальших досліджень.
4. Було встановлено, що PH домен білка BCR коімунопреципітує з білком FNBP1 в умовах спільної їх експресії в еукаріотичних клітинах 293T.
5. Створено генетичні конструкції для бактеріальної експресії, що кодують повнорозмірний білок FNBP1 та його N-кінцевий фрагмент. Завдяки цим конструкціям було отримано відповідні рекомбінантні білки та встановлено безпосередню взаємодію повнорозмірного FNBP1 та N-кінцевого фрагменту FNBP1 з PH доменом білка BCR в умовах *in vitro*.
6. Встановлено колокалізацію мишиних BCR та FNBP1 в клітинах макрофагів J774 в процесі фагоцитозу, що вказує на можливу спільну роль в цьому процесі.
7. Виявлено колокалізацію білка SMC1A з білком BCR в культурі клітин хронічної мієлоїдної лейкемії K562.
8. Створено генетичну конструкцію pET-42-HSPB1, завдяки якій було отримано рекомбінантний білок HSPB1, що дозволить провести з майбутньому дослідження щодо його взаємодії з PH доменом BCR.
9. За допомогою біоінформатичного аналізу здійснено передбачення можливих сайтів фосфорилювання серин/треонінкіназою BCR для досліджуваних білків. Для FNBP1 таких сайтів визначено 2, а також для HSPB1 – 1. Також були передбачені сайти потенційного фосфорилювання тирозинкіназою ABL1 у досліджуваних білках. Для FNBP1 таких сайтів

виявлено 3, для SMC1A – 3, для HSPB1 – 2. Ці дані дозволять в наступних дослідженнях вивчати можливу роль кіназних активностей BCR-ABL1 у регуляції функції цих білків.

10. Розроблено загальний підхід, на основі якого успішно створено генетичну конструкцію для застосування системи CRISPR-Cas9 проти точки розриву хромосомної транслокації t(9;22) в клітинах K562.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Kravchuk IV**, Gurianov DS, Antonenko SV, Telegeev GD. Primary insights into structure and structurally determined features of C2 domain of Bcr. *Biopolym Cell*. 2025;41(1):32–41. (**Дисертантом особисто проведено біоінформатичне передбачення структури, створено генетичну конструкцію, отримано рекомбінантний білок, проведено аналіз спектру кругового дихроїзму, підготовку до публікації*).
2. Gurianov DS, **Kravchuk IV**, Antonenko SV, Dybkov MV, Tesliuk MG, Telegeev GD. Distinct Functions of the PH Domain in BCR/ABL p210 Isoform: Interaction with Cytoskeletal and Membrane Remodeling Proteins. *Cytol Genet*. 2025 Apr 1;59(2):168–78. (**Дисертантом особисто проведено створення генетичної конструкції, отримання рекомбінантний білок, вивчення взаємодії між PH доменом білка BCR та FNBP1, підготовку до публікації*).
3. Antonenko SV, Gurianov DS, **Kravchuk IV**, Dybkov MV, Shvachko LP, Telegeev GD. Role of BCR and FNBP1 Proteins in Phagocytosis as a Model of Membrane Rearrangements with Chronic Myelogenous Leukemia. *Cytol Genet*. 2023 Aug 1;57(4):291–7. (**Дисертант особисто проводив мікроскопію та аналіз зображень*).
4. Antonenko SV, **Kravchuk IV**, Gurianov DS, Telegeev GD. Білки-партнери PH домену протеїна BCR-ABL: створення генетичних конструкцій для виявлення молекулярних особливостей розвитку ХМЛ. *Фактори Експериментальної Еволюції Організмів*. 2017;20:47–52. (**Дисертант особисто проводив створення генетичної конструкції та підготовку до публікації*).
5. Гур'янов ДС, Лисецька ТЮ, Антоненко СВ, **Кравчук ІВ**, Телегєєв ГД. Роль домену PH білка BCR у клітинних процесах, що визначають фенотип Ph⁺-позитивних мієлопроліферативних захворюваннях. *Фактори Експериментальної Еволюції Організмів*. 2014;15:44–8. (**Дисертант особисто проводив дослідження з коїмунопреципітації FNBP1 та PH домену білка BCR, брав участь у підготовці до публікації*).
6. Лисецька ТЮ, **Кравчук ІВ**, Телегєєв ГД. Білок-білкова взаємодія між FBP17 та PH доменом білка Bcr як основа для розуміння деяких механізмів розвитку Ph⁺-позитивних лейкоїд. *Вісник невідкладної та відновної медицини*. 2012;13(1):76–8. (**Дисертант особисто проводив дослідження з взаємодії N-кінцевого фрагменту FNBP1 та PH домену білка BCR, створення генетичних конструкцій, отримання рекомбінантних білків, брав участь у підготовці до публікації*).

7. Тютюнникова АП, Лисецька ТЮ, Гур'янов ДС, **Кравчук ІВ**, Телегеев ГД. Білки, що взаємодіють з РН доменом BCR-ABL, та їхня роль у формуванні пухлинного пухлинного фенотипу при розвитку мієлопроліферативних захворювань. Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. 2012;3:390–4. (**Дисертант особисто проводив створення генетичної конструкції, отримання рекомбінантних білків, брав участь у підготовці до публікації*).
8. Телегеев ГД, Гур'янов ДС, **Кравчук ІВ**, Лисецька ТЮ, Дибков МВ. Структурно-функціональні особливості химерних білків BCR/ABL і їх роль в патогенезі Ph-позитивних лейкемій. In: Актуальні питання гематології та трансфузіології. Київ; 2011. р. 143–4. (**Дисертант особисто проводив створення генетичної конструкції, брав участь у підготовці до публікації*)
9. Тютюнникова АП, **Кравчук ІВ**, Малюта ОВ, Дибков МВ, Малюта СС, Телегеев ГД. Роль Vcr та асоційованих із ним білків у розвитку мієлопроліферативних захворювань. Фактори Експериментальної Еволюції Організмів. 2011;11:536–40. (**Дисертант особисто проводив дослідження з коїмунопреципітації, брав участь у підготовці до публікації*)
10. Малюта ОВ, **Кравчук ІВ**, Тютюнникова АП, Лисецька ТЮ, Дибков МВ, Телегеев ГД. Структурно-функціональна роль доменів PH і C2 білка Vcr/Abl в розвитку Ph-позитивних лейкемій. In: Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології. Київ; 2010. р. 115–6. (**Дисертант особисто проводив створення генетичних конструкцій, отримання рекомбінантних білків, брав участь у підготовці до публікації*)
11. **Кравчук ІВ**, Малюта ОВ, Тютюнникова АП, Поліщук ЛО, Лисецька ТЮ, Телегеев ГД. Вивчення доменів онкопротеїну BCR/ABL, як шлях до розуміння патогенезу та розробки альтернативної терапії при лейкеміях з t(9;22). In: Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені ПЛ Шупика. Київ; р. 203–13. (**Дисертант особисто проводив створення генетичних конструкцій, отримання рекомбінантних білків, брав участь у підготовці до публікації*)
12. Zimina OV, **Kravchuk IV**, Telegeev GD. DNA editing of Bcr/Abl hybrid gene in K562. In: Abstract Book: BASEL LIFE. 2018. p. 59.
13. **Kravchuk IV**, Gurianov DS, Telegeev GD. Colocalization of SMC1 with BCR protein in K562 cells: a step to understanding of molecular effects of BCR-ABL. In: 22nd International Chromosome Conference Abstract Book. 2018. p. 1663.
14. Zimina OV, **Kravchuk IV**, Telegeev GD. CRISPR-Cas9 as promising technology to revert chromosome translocation in K562. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference – Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine.” The Ukrainian Biochemical Journal. 2018;90(Special Issue):193.
15. Antonenko SV, Gurianov DS, **Kravchuk IV**, Telegeev GD. Role of USP1, Cortactin And Hsp27 Proteins in Molecular Mechanisms that Affect CML Development. Exp Oncol. 2017;39(3):234.
16. **Kravchuk IV**, Lisetskaya TYu, Telegeev GD. Interaction between FBP17 and PH domain of Bcr-Abl Protein. In: MolOnco2012 The 1st Multidisciplinary

- Symposium “Molecular Oncology: from Laboratory Bench to Medicine” Abstract book. 2012. p. 45.
- 17. Kravchuk IV.** Role of PH and C2 domains of Bcr protein in development of Ph-positive leukemias. Materials of the 5th Conference of IMBG Young Scientists, dedicated to O. O. Bogomolets 130th Anniversary (24–25 May 2011). Biopolym Cell. 2011;27(4):318.
- 18. Telegeev G, Miroschnychenko D, Kravchuk I, Dybkov M, Maliuta S.** Role of BCR domains in pathogenesis of CML. In: Abstr Of Conference XXXIII World Congress of the International Society of Hematology, Jerusalem, Israel, October 10-13. 2010. p. 447.
- 19. Dubrovska AN, Kravchuk IV, Tyutyunnykova AP, Telegeev GD.** Bcr as Key Regulator of Bcr-Abl dependent Leukemogenesis. - International Conference “Tumor and Host: Novel Aspects of Old Problem.” 2010;32(1 suppl.):57.
- 20. Кравчук ІВ, Мірошніченко ДО, Телегєєв ГД.** Роль PH домену білка Bcr/Abl у розвитку ХМЛ. In: Фундаментальні та прикладні дослідження в біології. Донецьк; 2009. p. 139.

АНОТАЦІЯ

Кравчук І.В. Білок-білкові взаємодії PH домену та структурно-функціональні особливості C2 домену білка BCR при Ph'-позитивних лейкозах. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.03 «Молекулярна біологія». – Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, Київ, 2025.

Дисертаційна робота присвячена встановленню структурно-функціональних особливостей C2 домену BCR, вивченню взаємодії PH домену BCR з білками FNBP1, SMC1A, HSPB1 та розробці системи CRISPR-Cas9, направленої проти хромосомної перебудови t(9;22)(q34;q11).

В рамках дослідження C2 домену BCR було проведено біоінформатичне передбачення його вторинної та третинної структури, створено генетичну конструкцію для бактеріальної експресії, успішно отримано його у вигляді рекомбінантного білка. Для цього рекомбінантного C2 домену було валідовано структуру методом кругового дихроїзму, а також було виявлено його специфічне зв'язування з вісьмома фосфоліпідами.

Для встановлення взаємодії між FNBP1 та PH доменом білка BCR проводили із застосуванням широкого спектру методів. Зокрема було вперше виявлено взаємодію між PH доменом білка BCR та повнорозмірним завдяки їх коімунопреципітації після спільної експресії в еукаріотичних клітинах, а також методом пулдаун в умовах *in vitro*. Методом far-вестерн-блот аналізу підтвердили взаємодію саме з N-кінцевим фрагментом FNBP1. Вперше також була виявлена колокалізація білка BCR та FNBP1 в клітинах макрофагів J774 під час фагоцитозу.

За допомогою конфокальної мікроскопії було виявлено колокалізацію білка структурної підтримки хромосом SMC1A та BCR. В процесі виконання цієї роботи було створено генетичну конструкцію для бактеріальної експресії білка

HSPB1. Отриманий за допомогою цієї конструкції рекомбінантний білок може бути використаний для досліджень його взаємодії з PH доменом білка BCR. Під час виконання роботи було створено генетичні конструкції, що кодують в собі компоненти CRISPR-Cas9 системи націленої на хромосомну перебудову t(9;22)(q34;q11) в клітинах K562.

Ключові слова: Ph'-позитивні лейкемії, хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ), білок BCR, онкобілок BCR-ABL1, PH домен, C2 домен, білок FNBP1, білок SMC1A, білок HSPB1, CRISPR-Cas9.

SUMMARY

Kravchuk I.V. Protein-protein interactions of the PH domain and structural and functional features of the C2 domain of the BCR protein in Ph'-positive leukemias. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 03.00.03 "Molecular Biology". – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv., 2025.

Leukemias account for a significant proportion of the overall incidence of oncological diseases. One of the most well-known molecular events leading to malignant transformation in leukemias is the reciprocal chromosomal translocation t(9;22)(q34;q11), which forms the so-called Philadelphia chromosome. This chromosomal translocation occurs in various types of leukemias, for example, in chronic myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia, etc. They are often referred to as Ph'-positive leukemias, named after the Philadelphia chromosome. The primary consequence of this translocation is a break within the normal *BCR* and *ABL1* genes, followed by their fusion into a hybrid *BCR-ABL1* gene. Different variants of this hybrid gene have been identified, which differ by the breakpoint locations within the *BCR* gene, resulting in fusion genes containing fragments of varying sizes. Correspondingly, different BCR-ABL1 fusion proteins of distinct sizes are produced, differing in the set of domains included from the BCR part. The main therapeutic target in most current treatment approaches is the tyrosine kinase activity of the ABL1 portion of the hybrid oncoprotein, which is considered a key factor in malignant transformation. The ABL1 part of the protein is traditionally the most studied. Frequent cases of resistance to existing therapeutic agents highlight the importance of searching for both new targets and novel approaches in treatment of Ph'-positive leukemias.

For the search for new targets, studying the BCR protein appears promising, as this will allow, through understanding its role in the cell, to reveal the significance of the BCR portion in the hybrid oncoprotein BCR-ABL1. A strategy for investigating the function of the BCR protein may be to establish the structural and functional features of the domains of this protein. The structure and functions of the C2 domain of the BCR protein currently remain unknown. Preliminary studies using mass spectrometry have identified a number of candidate proteins interacting with the PH domain of the BCR protein. Among them were FNBP1, SMC1A, HSPB1. In the context of searching

for new approaches to therapy, editing chromosomal translocations using the CRISPR-Cas9 system can be considered an interesting option.

Therefore, the aim of this dissertation was to determine the structural and functional characteristics of the C2 domain of BCR, to study the interaction of the PH domain of BCR with the proteins FNBP1, SMC1A, and HSPB1, as well as to develop a CRISPR-Cas9 system targeting the chromosomal rearrangement.

As part of the study of the structural and functional features of the C2 domain of BCR, a bioinformatic prediction of the secondary and tertiary structure of this domain was carried out. Based on this, its boundaries within the amino acid sequence of BCR were determined. For the first time, a genetic construct for bacterial expression of the C2 domain of the BCR protein was created. This enabled the successful production and purification of the domain as a recombinant protein. The structural integrity of the obtained recombinant C2 domain was validated using circular dichroism spectroscopy. Spectrum analysis confirmed the presence of a high content of β -strands, which corresponded to the expected secondary structure of the C2 domain. The recombinant C2 domain of BCR was used to study its interaction with phospholipids. For the first time, its specific binding to eight phospholipids was identified, which may serve as a key to understanding the role of the C2 domain in recruiting the BCR protein to cellular membranes containing these phospholipids.

FNBP1 is an important protein involved in membrane folding processes. It can interact with membrane lipids and the actin cytoskeleton, due to which it performs its function in the formation of endosomes, phagosomes, invadopodia, etc. A wide range of methods were used to establish the interaction between FNBP1 and the PH domain of the BCR protein. In particular, the interaction between these proteins was first detected by co-immunoprecipitation of the PH domain of the BCR protein together with full-length FNBP1 after their co-expression in eukaryotic 293T cells. Additionally, a direct interaction between full-length FNBP1 and the PH domain of BCR was demonstrated *in vitro* using the pulldown assay. Subsequently, it was shown for the first time that this interaction is mediated by the N-terminal region of FNBP1. For this purpose, a recombinant protein corresponding to the first 293 amino acids of FNBP1, containing the functionally important F-BAR domain, was produced. The far-Western blot analysis confirmed the interaction of this fragment with the PH domain of BCR. Furthermore, colocalization of BCR and FNBP1 proteins was observed for the first time in J774 macrophage cells during phagocytosis.

SMC1A is a protein that provides structural maintenance to chromosomes. It is a component of the cohesin complex, which ensures the connection of sister chromatids and participates in the intranuclear organization of the genome as well as the regulation of gene expression. For the first time, colocalization of the SMC1A and BCR proteins was detected in K562 cells using confocal microscopy. Since the hybrid BCR-ABL1 protein is present in this cell line, the observed colocalization may also involve the oncoprotein. Disclosure of the details and functional consequences of this colocalization requires further investigation.

HSPB1 is a member of the small heat shock protein family and is involved in cellular responses to various types of stress. During this work, a genetic construct for bacterial expression of the protein was created. The recombinant protein produced using this construct can be used for further studies of its interaction with the PH domain of the BCR protein.

Another outcome of this dissertation was the development of an approach to identify specific fusion region sequences in hybrid genes formed as a result of chromosomal translocation. Using this approach, the fusion sequence in the *BCR-ABL1* gene from the leukemic K562 cell line was determined. This sequence was used as a target to create genetic constructs encoding components of the CRISPR-Cas9 system aimed at the chromosomal rearrangement t(9;22)(q34;q11) in K562 cells. This may be used for future experimental evaluation in the K562 model culture of the potential application of CRISPR-Cas9 for Ph-positive leukemias.

Key words: Ph'-positive leukemias, chronic myeloid leukemia (CML), BCR, oncoprotein BCR-ABL1, PH domain, C2 domain, FNBP1, SMC1A, HSPB1, CRISPR-Cas9.

ДЛЯ НОТАТОК