

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова праця

на правах рукопису

КРАВЧУК ІГОР ВАСИЛЬОВИЧ

УДК :577.2.575

ДИСЕРТАЦІЯ

Білок-білкові взаємодії РН домену та структурно-функціональні особливості С2 домену білка VCR при Ph⁺-позитивних лейкозах

03.00.03 –молекулярна біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ І.В. Кравчук

Науковий керівник: **Телегєєв Геннадій Дмитрович**, доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу молекулярної генетики.

Київ – 2025

АНОТАЦІЯ

Кравчук І.В. Білок-білкові взаємодії PH домену та структурно-функціональні особливості C2 домену білка BCR при Ph'-позитивних лейкоміях. – 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.

Лейкемії становлять значну частку в структурі загальної захворюваності на онкологічні захворювання. Одною з найбільш відомих молекулярних подій, що призводить до злоякісної трансформації при лейкоміях є реципрокна хромосомна транслокація $t(9;22)(q34;q11)$, що формує так звану філадельфійську хромосому. Така хромосомна транслокація трапляється при різних видах лейкомії, наприклад, при хронічній мієлоїдній лейкомії, гострій лімфобластній лейкомії, гострій мієлоїдній лейкомії тощо. Вони дістали загальне позначення як Ph'-позитивні лейкомії, від Philadelphia chromosome. Основним наслідком цієї транслокації є розрив в межах нормальних генів *BCR* і *ABL1* з наступним їх злиттям у гібридному гені *BCR-ABL1*. Виявлені різні варіанти цього гібридного гена, які відрізняються різними точками розриву в гені *BCR*, внаслідок цього фрагменти різного розміру потрапляють в кінцевий злитий ген. Відповідно до утворених варіантів гібридних генів, продукуються різні за розміром білки BCR-ABL1, що відрізняються за набором доменів, що входять в склад BCR частини. Мішенню для більшості сучасних методів терапії виступає тирозинкіназна активність ABL1 частини гібридного онкобілка, яка вважається ключовим фактором злоякісної трансформації. Саме ABL1 частина білка є традиційно більш вивченою. Часті випадки розвитку резистентності до застосовуваних терапевтичних агентів вказує на актуальність пошуку як нових мішеней, так і нових підходів у лікуванні Ph'-позитивних лейкомії.

Для пошуку нових мішеней перспективним виглядає дослідження BCR білка оскільки це дозволить через розуміння його ролі в клітині розкрити значення і тої частини, що входить в склад гібридного онкобілка BCR-ABL1. Стратегією вивчення функції білка BCR може бути встановлення структурно-функціональних особливостей доменів цього білка. Структура та функції C2 домену білка BCR на даний момент є невивченими. Попередні дослідження з використання мас-спектрометрії виявили ряд білків-кандидатів по взаємодії з PH доменом білка BCR. Серед них були FNBP1, SMC1A, HSPB1. В контексті пошуку нових підходів до терапії цікавим варіантом можна вважати редагування хромосомних транслокацій за допомогою системи CRISPR-Cas9.

Тому метою даної дисертаційної роботи було встановлення структурно-функціональних особливостей C2 домену BCR, вивчення взаємодії PH домену BCR з білками FNBP1, SMC1A, HSPB1, а також розробка системи CRISPR-Cas9, направленої проти хромосомної перебудови.

В рамках дослідження структурно-функціональних особливостей C2 домену BCR було проведено біоінформатичне передбачення вторинної та третинної структури цього домена. На основі цього було визначено його межі в амінокислотній послідовності BCR. Вперше було створено генетичну конструкцію для бактеріальної експресії C2 домену білка BCR. Це дозволило успішно отримати та очистити його у вигляді рекомбінантного білка. Відповідність структури отриманого рекомбінантного C2 домену валідували методом кругового дихроїзму. Аналіз спектру підтвердив наявність високого вмісту β -ланцюгів, що відповідало очікуваній вторинній структурі C2 домену. Рекомбінантний C2 домен білка BCR був використаний для вивчення його взаємодії з фосфоліпідами. Вперше було виявлено його специфічне зв'язування з вісьмома фосфоліпідами, що може послужити ключем для розуміння ролі C2 домену в рекрутуванні білка BCR до клітинних мембран, які містять в собі ці фосфоліпіди.

Білок FNBP1 є важливим білком, що залучений у процесах вигинання мембран. Він здатен взаємодіяти з ліпідами мембран та актиновим цитоскелетом,

завдяки чому виконує свою функцію у формуванні ендосом, фагосом, інвадоподій тощо. Для встановлення взаємодії між FNBP1 та PH доменом білка BCR проводили із застосуванням широкого спектру методів. Зокрема було вперше виявлено взаємодію між цими білками завдяки коімунопреципітації PH домену білка BCR разом з повнорозмірним FNBP1 після їх спільної експресії в еукаріотичних клітинах 293T. Додатково було показано безпосередню взаємодію між повнорозмірним FNBP1 та PH доменом білка BCR в умовах *in vitro* завдяки застосуванню методу пулдаун. Після цього було вперше показано, що виявлена взаємодія забезпечується N-кінцевим регіоном FNBP1. Для цього отримували рекомбінантний білок, що відповідав першим 293 амінокислотам білка FNBP1 та містив важливий для його функціонування домен F-BAR. Методом far-вестерн-блот аналізу підтвердили взаємодію цього фрагменту з PH доменом білка BCR. Вперше також була виявлена колокалізація білка BCR та FNBP1 в клітинах макрофагів J774 під час фагоцитозу.

SMC1A є білком, який здійснює структурну підтримку хромосом. Зокрема він є компонентом когезинового комплексу, забезпечує з'єднання сестринських хроматид, бере участь у внутрішньоядерній організації геному та регуляції експресії генів. Вперше за допомогою конфокальної мікроскопії на клітинах K562 було виявлено колокалізацію білка SMC1A та BCR. Оскільки у клітинах цієї культури присутній гібридний BCR-ABL1, то виявлена співлокалізація може стосуватись також і онкобілка. Розкриття деталей та функціональних наслідків цієї колокалізації потребує додаткових досліджень.

HSPB1 є представником родини малих білків теплового шоку та залучений в реакції клітин на різні види стресів. В процесі виконання цієї роботи було створено генетичну конструкцію для бактеріальної експресії білка. Отриманий за допомогою цієї конструкції рекомбінантний білок може бути використаний для подальших досліджень його взаємодії з PH доменом білка BCR.

Результатом даної дисертаційної роботи була також розробка підходу до пошуку специфічних послідовностей регіонів злиття у гібридних генах, які утворюються внаслідок хромосомної транслокації. Із застосуванням цього

підходу була встановлена послідовність злиття в гені *BCR-ABL1*, яка характерна для культури лейкемічних клітин K562. Вона була використана як мішень для створення генетичних конструкцій, що кодують в собі компоненти CRISPR-Cas9 системи націленої на хромосомну перебудову t(9;22)(q34;q11) в клітинах K562. Це може бути використано для майбутньої експериментальної оцінки на модельній культурі K562 перспективності застосування CRISPR-Cas9 для Ph⁺-позитивних лейкемій.

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.

Список публікацій здобувача 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.
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.
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.
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.

5. Гур'янов ДС, Лисецька ТЮ, Антоненко СВ, **Кравчук ІВ**, Телегєєв ГД. Роль домену РН білка BCR у клітинних процесах, що визначають фенотип Ph`-позитивних мієлопроліферативних захворюваннях. Фактори Експериментальної Еволюції Організмів. 2014;15:44–8.
6. Лисецька ТЮ, **Кравчук ІВ**, Телегєєв ГД. Білок-білкова взаємодія між FBP17 та РН доменом білка Vcr як основа для розуміння деяких механізмів розвитку Ph`-позитивних лейкоїд. Вісник невідкладної та відновної медицини. 2012;13(1):76–8.
7. Тютюнникова АП, Лисецька ТЮ, Гур'янов ДС, **Кравчук ІВ**, Телегєєв ГД. Білки, що взаємодіють з РН доменом BCR-ABL, та їхня роль у формуванні пухлинного фенотипу при розвитку мієлопроліферативних захворювань. Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. 2012;3:390–4.
8. Телегєєв ГД, Гур'янов ДС, **Кравчук ІВ**, Лисецька ТЮ, Дибков МВ. Структурно-функціональні особливості химерних білків BCR/ABL і їх роль в патогенезі Ph-позитивних лейкоїд. In: Актуальні питання гематології та трансфузіології. Київ; 2011. р. 143–4.
9. Тютюнникова АП, **Кравчук ІВ**, Малюта ОВ, Дибков МВ, Малюта СС, Телегєєв ГД. Роль Vcr та асоційованих із ним білків у розвитку мієлопроліферативних захворювань. Фактори Експериментальної Еволюції Організмів. 2011;11:536–40.
10. Малюта ОВ, **Кравчук ІВ**, Тютюнникова АП, Лисецька ТЮ, Дибков МВ, Телегєєв ГД. Структурно-функціональна роль доменів РН і С2 білка Vcr/Ab1 в розвитку Ph-позитивних лейкоїд. In: Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології. Київ; 2010. р. 115–6.
11. **Кравчук ІВ**, Малюта ОВ, Тютюнникова АП, Поліщук ЛО, Лисецька ТЮ, Телегєєв 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.
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, Miroshnychenko 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 домена білка Bcr/Abl у розвитку ХМЛ. In: Фундаментальні та прикладні дослідження в біології. Донецьк; 2009. p. 139.

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, FBNP1, SMC1A, HSPB1, CRISPR-Cas9.

List of scientific publications published on the topic of the dissertation:

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.
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.
3. Antonenko SV, Gurianov DS, **Kravchuk IV**, Dybkov MV, Shvachko LP, Telegeev GD. Role of BCR and FBNP1 Proteins in Phagocytosis as a Model of Membrane Rearrangements with Chronic Myelogenous Leukemia. *Cytol Genet*. 2023 Aug 1;57(4):291–7.
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.
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.
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 лейкозів. Вісник невідкладної та відновної медицини. 2012;13(1):76–8.
7. Тютюнникова АП, Лисецька ТЮ, Гур'янов ДС, **Кравчук ІВ**, Телегеев ГД. Білки, що взаємодіють з PH 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.
 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 лейкозів. In: Актуальні питання гематології та трансфузіології. Київ; 2011. p. 143–4.
 9. Тютюнникова АП, **Кравчук ІВ**, Малюта ОВ, Дибков МВ, Малюта СС, Телегеев ГД. Роль Bcr та асоційованих із ним білків у розвитку мієлопроліферативних захворювань. Фактори Експериментальної Еволюції Організмів. 2011;11:536–40.
 10. Малюта ОВ, **Кравчук ІВ**, Тютюнникова АП, Лисецька ТЮ, Дибков МВ, Телегеев ГД. Структурно-функціональна роль доменів PH і C2 білка Bcr/Abl в розвитку Ph-позитивних лейкозів. In: Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології. Київ; 2010. p. 115–6.
 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 лейкозах з t(9;22). In: Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені ПЛ Шупика. Київ; p. 203–13.
 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, Miroshnychenko 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. Dubrovskaya 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, Телегеев ГД. Роль РН домена білка Vcr/Abl у розвитку ХМЛ. In: *Фундаментальні та прикладні дослідження в біології*. Донецьк; 2009. p. 139.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	20
ВСТУП.....	22
РОЗДІЛ 1	28
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	28
1.1. Хромосомна транслокація t(9;22)(q34;q11)	28
1.1.1. Ген <i>ABL1</i> та його експресія.....	28
1.1.2. Будова та функції нормального білка ABL1.	29
1.1.3. Роль білка ABL1 у патологіях людини	33
1.1.4. Ген <i>BCR</i>	34
1.1.5. Доменна структура білка BCR	34
1.1.6. РН домен білка BCR.....	37
1.1.7. C2 домен білка BCR	38
1.1.8. Злиття генів <i>BCR-ABL1</i> та його зв'язок з онкогематологічними захворюваннями	39
1.2. Білок FNBP1	41
1.2.1. Структура гена, що кодує FNBP1, та його експресія	41
1.2.2. Доменна структура білка FNBP1	42
1.2.3. Функції білка FNBP1 в клітині.....	43
1.2.4. Зв'язок білка FNBP1 з раковими та іншими захворюваннями.	44
1.3. Білок SMC1A.....	45
1.3.1. Ген <i>SMC1A</i> та його експресія	45
1.3.2. Структура та функції білка SMC1A.....	46
1.3.3. Зв'язок SMC1A з захворюваннями людини.....	47
1.4. Білок HSPB1	47

	17
1.4.1. Ген <i>HSPB1</i> та його експресія.....	47
1.4.2. Структура білка HSPB1.....	48
1.4.3. Роль HSPB1 у патології.....	49
1.5. CRISPR-Cas як інструмент до нових видів терапій.....	49
РОЗДІЛ 2	51
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	51
2.1. Обладнання, використане в роботі	51
2.2. Розчини та реагенти, використані в роботі.....	51
2.3. Поживні середовища для вирощування бактерій	52
2.4. Поживні середовища для вирощування культур еукаріотичних клітин	53
2.5. Використані ферменти та буфери для їх роботи	53
2.6. Антитіла та барвники, використані в роботі	53
2.7. Вектори та генетичні конструкції.....	54
2.8. Штами <i>E. coli</i> , що використовувались в роботі.....	54
2.9. Культури еукаріотичних клітин	55
2.10. Отримання компетентних клітин <i>E. coli</i> та їх трансформація плазмідною ДНК.....	56
2.11. Загальні методи роботи з нуклеїновими кислотами	57
2.11.1. Полімеразна ланцюгова реакція.....	57
2.11.2. Виділення плазмідної ДНК методом лужного лізису	58
2.11.3. Виділення плазмідної ДНК з використанням неіонних детергентів.....	59
2.11.4. Очищення плазмідних векторів	59
2.11.5. Очищення ДНК на колонках з фільтрами із скловолокна.....	60
2.11.5. Рестрикція ДНК	60
2.11.6. Лігування фрагментів ДНК	60

	18
2.11.7. Незалежне від послідовності та лігування клонування	61
2.11.8. Фосфорилування фрагментів ДНК.....	62
2.11.9. Дефосфорилування фрагментів ДНК.....	62
2.11.11. Golden Gate збірка	62
2.12. Бактеріальна експресія.....	63
2.13. Методи роботи з білками.....	64
2.13.1 Виділення та очищення білків з полігістидиною міткою.....	64
2.13.2. Виділення та очищення білків зв'язаних з глутатіон-S-трансферазою ...	65
2.13.3. Електрофоретичне розділення білків у поліакриламідному гелі	66
2.13.4. Вестерн-блот аналіз.....	67
2.13.5. GST-пулдаун.....	68
2.14. Круговий дихроїзм	68
2.15. Аналіз зв'язування з фосфоліпідами	69
2.16. Культивування еукаріотичних клітин.....	70
2.17. Трансфекція еукаріотичних клітин.....	70
2.18. Приготування лізатів еукаріотичних клітин	71
2.19. Коїмунопреципітація.....	71
2.20. Конфокальна мікроскопія.....	72
2.21. Біоінформатичні інструменти використані в роботі.....	73
РОЗДІЛ 3	74
РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	74
3.1. Вивчення структурно-функціональних особливостей C2 домену	74
3.1.1. Моделювання вторинної та третинної структури C2 домену білка BCR..	74
3.1.2. Створення генетичної конструкції pET28-C2.....	77
3.1.3. Отримання очищеного рекомбінантного C2 домену білка BCR	78

3.2. Білок-білкова взаємодія між BCR та FNBP1	84
3.2.1. Коімунопреципітація PH домену білка BCR з повнорозмірним FNBP1 у клітинах 293T.....	84
3.2.2. Створення генетичної конструкції pGEX-4T-FNBP1	85
3.2.3. Виявлення взаємодії повнорозмірного FNBP1 з PH доменом BCR за допомогою GST-пулдауну.....	86
3.2.4. Створення генетичної конструкції pGEX-4T-FNBP1-N	87
3.2.5. Встановлення взаємодії між N-кінцевим фрагментом FNBP1 та PH доменом білка BCR	89
3.2.6. Колокалізація FNBP1 з білком BCR в процесі фагоцитозу.....	91
3.2.4. Аналіз сайтів фосфорилування білка FNBP1	93
3.3. Взаємозв'язок між SMC1A та BCR	95
3.3.1. Колокалізація SMC1A з білком BCR.....	95
3.3.2. Аналіз сайтів фосфорилування SMC1A	97
3.4. Перші етапи вивчення взаємодії між HSPB1 та BCR.....	99
3.4.1. Створення генетичної конструкції pET-42-HSPB1 та її експресія	99
3.4.2. Аналіз сайтів фосфорилування HSPB1	100
3.5. Створення конструкції CRISPR-Cas9 націленої на точку розриву хромосомної транслокації	102
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	104
ВИСНОВКИ.....	111
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	113
ДОДАТОК А.....	139

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

а.з.	амінокислотні залишки
ГЛЛ	гостра лімфобластна лейкемія
кДа	кілодальтон
мкл	мікролітр
ПЛР	полімеразно-ланцюгова реакція
п. н.	пари нуклеотидів
ХМЛ	хронічна мієлоїдна лейкемія
ABL1	Гомолог 1 онкогена вірусного лейкозу мишей Абельсона, Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
BCR	ділянка кластерів розриву
C2	кальцій зв'язувальний домен 2 (calcium-binding domain 2)
CTCF	фактор зв'язування CCCTC, CCCTC-binding factor
EDTA	етилендіамінтетраоцтова кислота
F-BAR	гомологія Fes/CIP4-Bin/Амфіфізин/Rvs
FNBP1	формін зв'язувальний білок 1 (formin binding protein 1)
GST	glutathione S-transferase, глутатіон-S-трансфераза
HSPB1	білок теплового шоку 1 з родини В (heat shock protein family В member 1)
NES	nuclear export signal, сигнальна послідовність для експортування з ядра
NID	неіонний детергент
NLS	nuclear-localization signal, сигнальна послідовність для ядерної локалізації
Ph'-хромосома	філадельфійська хромосома (Philadelphia chromosome)
PAM	суміжний мотив протоспейсера, protospacer adjacent motif
PBS	фосфатно-буферний фізіологічний розчин, phosphate-buffered saline
PCH	Pombe Cdc15 homology

PH	плекстрин-гомологічний домен (pleckstrin homology domain)
PMSF	фенілметилсульфонілфторид
SDS	додецилсульфат натрію
SMC1A	білок структурної підтримки хромосом 1 (structural maintenance of chromosomes 1)
Tris	трис(гідроксиметил)амінометан
UTR	untranslated region

ВСТУП

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 (1). Найбільшу частку серед захворювань цієї групи становили лейкомії – 39,2%, при цьому 23,8% хворих на лейкомію не пережили року (1).

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 гена *BCR*, що розміщується на 22 хромосомі, та привнесеного з частини 9 хромосоми фрагменту *ABL1* гена. 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 (2,3). Найдовший p230 варіант пов'язують з випадками варіанта нейтрофільного ХМЛ, який є більш доброякісним за типовий ХМЛ (4). 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. P1 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 P1 доменом BCR, серед яких були білки FBNP1, SMC1A та HSPB1 (5). Структура та функції C2 домена 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 домена 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 домена білка BCR структурі, передбаченій біоінформатично.
3. Дослідити потенційне зв'язування C2 домена 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 повнорозмірного білка FNBP1 і його N-кінцевого фрагменту та вивчити їх безпосередню взаємодію з PH доменом BCR в умовах *in vitro*.
6. Дослідити колокалізацію білків BCR та FNBP1 у 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 Hsp27 для оцінки можливої ролі кіназної активності BCR-ABL1 у їх регуляції.
10. Розробити генетичні конструкції для системи CRISPR-Cas9, націлених на порушення в точці 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 білка BCR та гібридного онкобілка BCR-ABL1 у клітинних процесах, що є обумовленою його C2 та PH доменами.

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, коімунопреципітація, 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 домена білка BCR з вісьмома різними фосфоліпідами. Вперше було показано взаємодію білка FNBP1 з PH доменом білка BCR шляхом коімунопреципітації 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 домена 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. Рекombінантний C2 домен білка BCR може бути використаний у майбутніх дослідженнях тривимірної структури цього домена, що є важливою основою для розуміння його функціонування. Встановлена взаємодія PH домена 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 всередині лейкемічних клітин. 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 рекombінантних 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 в цілому здійснювались самостійно, але із допомогою та 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Хромосомна транслокація $t(9;22)(q34;q11)$

У 1960 році Nowell та Hungerford опублікували статтю, в якій описали виявлений в хворих на лейкемію вкорочений варіант 22 хромосоми (6,7). Цей феномен дістав назву філадельфійська (або скорочено Ph) хромосома за місцем відкриття. Пізніше знання про цю Ph-хромосому було доповнено спостереженням щодо змін і на 9 хромосомі, тобто було встановлено, що має місце реципрокна хромосомна транслокація між 22 та 9 хромосомами (7,8). Філадельфійську хромосому виявляють при кількох різних онкогематологічних захворюваннях. Вона є першим класичним прикладом генетичних аномальних змін, які чітко асоційовані зі злоякісною трансформацією.

Зараз нам відомо, що в процесі хромосомної транслокації відбуваються розриви в нормальних генах *BCR* та *ABL1*, результатом чого є злиття їх фрагментів і формування гібридного гена *BCR-ABL1*. На основі цього нового гена продукується відповідний гібридний протеїн, що є ключовим для злоякісного перетворення клітин. Для того, щоб глибше розкрити суть процесів, які спричиняються даною транслокацією, потрібне детальне розуміння ролі нормальних білків *ABL1* та *BCR*. На основі цього знання можлива належна реконструкція роботи химерного *BCR-ABL1*.

1.1.1. Ген *ABL1* та його експресія. Ген розміщений на 9 хромосомі (9q34.12) та складається з 12 екзонів. Відомі дві варіанти транскрипції а та b, які відрізняються тим, який з двох альтернативних 5'-термінальних екзонів (1a чи 1b) входить в склад остаточного транскрипту (рис. 1.1.a). Варіант а (NM_005157 в базі NCBI), відповідно, відрізняється 5'-UTR та 5'-кодуювальною ділянкою та є коротшим за варіант b (NM_007313) (9).

амінокислот в своєму поліпептидному ланцюгу. Ізоформа **a** довжиною 1130 а.з. Варіант **b** має на N-кінці гліцин в другому положенні, який може бути міристикльований, що є важливим для регуляції ABL1. Заміна цього гліцину на аланін призводила до того, що міристикльовання не відбувалось, а активність ABL1 була значно вищою порівняно з диким типом (15).

Цікаво, що N-міристикльованість білка може направляти його до плазматичної мембрани (16). Для ABL1 були дослідження, які демонстрували, що частина міристикльованого білка справді асоціювалась з внутрішньою стороною плазматичної мембрани (17). Проте у випадку ABL1 картина клітинної локалізації є дещо складнішою. На рівні білка ABL1 виявляється у ядрі та цитоплазмі (18,19). Ядерна локалізація пов'язана з наявністю трьох сигнальних послідовностей NLS (nuclear-localization signals), які розміщені в кількох місцях поліпептидного ланцюга (19–21). Окрім цього на C-кінці ABL1 наявна сигнальна послідовність NES (nuclear export signal), що дозволяє переміщуватись протеїну з ядра у цитоплазму (19,22). Таким чином ABL1 може бути присутній у багатьох компартментах клітини, може переміщуватись між ними та, імовірно, може мати різні функції залежно від локалізації (19).

Доменна організація ABL1 подібна до притаманної представникам родини Src кіназ (Рис 1.2.). Послідовно в напрямку від N-кінця присутні домени SH3, SH2 та власне тирозинкіназний домен. SH3 та SH2 домени разом пригнічують кіназну активність ABL1 (23).

SH3 домен білка ABL1 розміром порядку 60 а.з. та складається з двох антипаралельних β -листіків, що упаковані ортогонально (24–26). Цей домен зв'язується з багатими на пролін ділянками. Зокрема він може зв'язуватись з лінкерною ділянкою між SH2 доменом та кіназним доменом самого ABL1, пригнічуючи кіназну активність в такому положенні. Видалення SH3 домену або заміна пролінових залишків на аланінові у лінкерній ділянці приводило активації кіназної активності (23).

Наступним після SH3 розміщений SH2 домен довжиною близько 90 а.з. Структура SH2 домена білка ABL1 складається з центрального β -листка, по обом

бокам якого є α -спіралі. В ньому можна розрізнити дві кишені, які здатні розпізнавати послідовності з фосфорильованим тирозином (23,25).

Тирозинкіназний домен ABL1 є центральним компонентом білка ABL1 і відіграє ключову роль у клітинній сигналізації та розвитку певних видів лейкемій. Його структура є високо консервативною та тонко регульованою, що забезпечує точний контроль над його кіназною активністю. Тирозинкіназний домен ABL1 має класичну дводолеву архітектуру, що складається з меншої N-кінцевої долі та більшої C-кінцевої долі. N-термінальна доля складається з β -листіків, містить сайт для зв'язування АТФ та взаємодіє з регуляторними доменами (11,27). C-кінцева доля складається в основному з α -спіралей та містить петлю активації та сайт зв'язування з субстратом (11,27). Така будова є типовою для протеїнкіназ і є необхідною для зв'язування АТФ та фосфорилування субстратів (11). Інтерфейс між цими долями утворює активний сайт, де відбувається фосфорилування тирозинових залишків. Конформація домену є динамічною, переключаючись між активним та неактивним станами, що є ключовим для його регуляторних механізмів (28,29)

Тирозинкіназний домен ABL1 відповідає за перенесення фосфатних груп на тирозинові залишки білків-субстратів, що активує низку сигнальних шляхів у клітині. У контексті фузійного білка BCR-ABL1 цей домен стає конститутивно активним, що призводить до неконтрольованої проліферації клітин і стійкості до апоптозу — ключових процесів у патогенезі хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ) (11,30,31). Саморегуляція тирозинкіназного домену ABL1 включає міристоїл-зв'язувальну кишеню та взаємодії з SH2/SH3 доменами, що підтримують інгібований стан кінази. Кіназний домен є основною мішенню для терапій. Тирозинкіназні інгібітори (TKI), такі як іматиніб, націлені на АТФ-зв'язувальне місце тирозинкіназного домену, пригнічуючи його активність. Алостеричні інгібітори, зокрема аскімініб, зв'язуються з міристоїл-зв'язувальною кишенею, пропонуючи альтернативний механізм інгібування активності кінази, особливо у випадках резистентності до АТФ-конкурентних інгібіторів (11,30,32,33).

ABL1 містить у своєму С-кінцевому регіоні унікальний домен зв'язування з ДНК. Цей домен відрізняється від кіназного та актин-зв'язувального доменів і поєднаний із сигналами ядерної локалізації, що дозволяє ABL1 транспортуватися в ядро клітини. Через цей домен ABL1 може брати участь у регуляції функцій, пов'язаних із ДНК, зокрема у процесах репарації та транскрипції (12). Домен зв'язування з ДНК білка ABL1 є критично важливим для його ролі у відповіді на пошкодження ДНК. Після ушкодження ДНК ABL1 може транспортуватися в ядро клітини та безпосередньо зв'язуватися з ДНК, сприяючи активації процесів репарації (12,34). Останні дослідження показали, що активність ABL1 у ділянках подвійних розривів ДНК (double-strand breaks, DSBs) пов'язана з утворенням місць концентрації молекул РНК-полімерази II та синтезом у відповідь на пошкодження транскриптів, які важливі для рекрутування факторів репарації ДНК і активації сигнального шляху відповіді на пошкодження ДНК (35). Активність та локалізація ABL1, включаючи його функцію зв'язування з ДНК, жорстко регулюються посттрансляційними модифікаціями та взаємодією з різними партнерами зв'язування. Ці регуляторні механізми забезпечують активацію ABL1 функцій зв'язування та репарації ДНК у відповідь на специфічні клітинні сигнали, такі як пошкодження ДНК, і залежать від контексту, змінюючись залежно від типу клітин та умов. Ця функція особливо актуальна в контексті гемопоетичних злоякісних новоутворень, де порушення регуляції ABL1, наприклад, у злитих білках BCR-ABL1, може порушувати нормальні процеси репарації ДНК та сприяти онкогенезу. (12,34).

Блок ABL1 містить спеціалізований актин-зв'язувальний домен. Він дозволяє ABL1 безпосередньо взаємодіяти з актиновими філаментами, пов'язуючи його кіназну активність з регуляцією актинового цитоскелету. Актин-зв'язувальний домен є висококонсервативним серед білків родини ABL, що відображає його фундаментальну роль у клітинній архітектурі та сигналізації (12). Через цей домен ABL1 може опосередковувати ремоделювання актину у відповідь на сигнали розвитку та стимули навколишнього середовища, впливаючи на такі процеси, як міграція клітин та міжклітинний контакт. Функція

зв'язування актину жорстко регулюється та інтегрує сигнали від активаторів, розташованих вище в сигнальному шляху, включаючи RIN1, який зв'язується з ABL1 та стимулює його кіназну активність, що ще більше сприяє змінам актинового цитоскелета. Порушення актин-зв'язувальних механізмів може призвести до аберантної міграції та адгезії клітин, що сприяє прогресуванню раку та метастазуванню. (12,36).

1.1.3. Роль білка ABL1 у патологіях людини. ABL1 вперше був ідентифікований як ключовий онкоген при лейкемії, зокрема ХМЛ, де злитий білок BCR-ABL1 призводить до неконтрольованої проліферації та стійкості до апоптозу. Впровадження інгібіторів ABL-кінази, таких як іматиніб, здійснило революцію в лікуванні ХМЛ, цілеспрямовано впливаючи на аберантну кіназну активність (11,37). Окрім ХМЛ, ABL1 пов'язаний з іншими лейкеміями, включаючи ті, що мають злиття TEL-ABL1 та NUP214-ABL1, де він може діяти як онкогенний драйвер, так і, у своїй нормальній формі, як супресор пухлини, що обмежує зляквісну прогресію та геномну нестабільність. Втрата нормальної функції ABL1 у цих контекстах посилює проліферацію стовбурових клітин лейкемії, погіршує диференціацію та збільшує хромосомні аберації (38,39). Серед інших химерних злитих генів, які виявляли при різних онкогематологічних захворюваннях, можна зазначити *ETV6-ABL1*, *RCSD1-ABL1*, *SFPQ-ABL1*, *ZMIZ1-ABL1*, *EML1-ABL1*, *FOXP1-ABL1*, *SNX2-ABL1* (31,37).

Нещодавні дослідження розширили знання щодо ролі ABL1 в солідних пухлинах, де його надмірна експресія та активація пов'язані зі зміненою полярністю клітин, посиленою інвазією та ростом пухлини. Ці результати свідчать про те, що терапія, спрямована на ABL1, може бути корисною не лише для гематологічних видів раку, але й для солідних пухлин з підвищеною активністю ABL1 (37,40). При гепатоцелюлярній карциномі висока експресія ABL1 корелює з поганим прогнозом та підвищеною інфільтрацією імунних клітин, що свідчить про роль у прогресуванні пухлини та імуномодуляції (41).

Мутації в гені ABL1 пов'язують з аутосомно-домінантним синдромом, що характеризується вродженими вадами серця, вадами розвитку скелета та

затримкою розвитку. Ці мутації призводять до підвищеної активності кінази ABL1, що підкреслює її важливість для нормального розвитку організму та потенційні наслідки порушення її регуляції (42).

ABL1 також відіграє певну роль у запаленні та нейродегенеративних захворюваннях. Він активується різними стимулами та регулює динаміку цитоскелета, виживання клітин та проліферацію у відповідь на запальні сигнали. При хворобі Альцгеймера аберантна активація ABL1 сприяє розбиранню початкового сегмента аксона, порушенням сортування тау-білка та нейрональній дисфункції, що підкреслює його залученість (40,43) у нейродегенеративній патології (40,43).

1.1.4. Ген *BCR*. Ген, який кодує білок BCR, розміщений на довгому плечі 22 хромосоми (22q11.23). В ньому вирізняють 23 екзони (рис. 1.1.б).

BCR експресується в гемопоетичних клітинах, де він найбільше вивчений через свою участь у лейкемії, але він також присутній в інших типах клітин, включаючи епітеліальні клітини та ендотеліальні клітини. BCR знаходиться в епітеліальних тканинах, де він взаємодіє з мембранно-асоційованими білками, що свідчить про його роль поза цитоплазмою (44). BCR експресується в судинних ендотеліальних клітинах, де він опосередковує захисні реакції на ліпопротеїни високої щільності та бере участь у підтримці цілісності ендотелію (45). Спостерігається дещо підвищена експресія в нейронах (46).

1.1.5. Доменна структура білка BCR. В складі білка BCR в напрямку від N-кінця наявні такі функціональні ділянки: регіон олігомеризації, серин/треонінова протеїнкіназа, DH домен, PH домен, C2 домен, GAP домен (рис. 1.2). Оскільки домени PH та C2 є в центрі уваги даної роботи інформація про них буде розглянута далі в окремих підрозділах.

N-кінцева область BCR (амінокислоти 1–63) утворює спіраль-клубочний домен, необхідний для олігомеризації. Цей домен дозволяє BCR утворювати гомотетрамери, що є вирішальним для активації сигнального шляху, включаючи функції тирозинкінази та актин-зв'язування при злитті з ABL1 в онкопротеїнах

BCR-ABL1. Порушення в цьому домені погіршує олігомеризацію та скасовує трансформаційну активність (47–49).

Серин/треонінкіназний (STK) домен BCR кодується в першому екзоні гена. Цей домен відповідає за внутрішню кіназну активність білка BCR, який є фосфопротеїном 160 кДа. Кіназний домен перекривається з ділянками, що зв'язуються з доменами SH2, і містить парні залишки цистеїну, необхідні для його фосфотрансферазної активності. Білок BCR може аутофосфорилувати, а також трансфосфорилувати кілька білкових субстратів, демонструючи виражену серин/треонінкіназну активність (50). Фосфорилування тирозину в BCR, особливо за залишками Y328 та Y360, значно погіршує його серин/треонінкіназну активність. Мутації в цих сайтах (Y328F, Y360F) призводять до порушення транскіназної активності, хоча деяка аутокіназна активність може бути збережена (51–53). Кіназна активність BCR має інгібувальний вплив на онкогенні сигнальні шляхи BCR-ABL1. Мутації, що порушують STK-домен (наприклад, S354A, Y360F), скасовують цю інгібувальну функцію і можуть навіть посилювати онкогенні ефекти BCR-ABL1 (54).

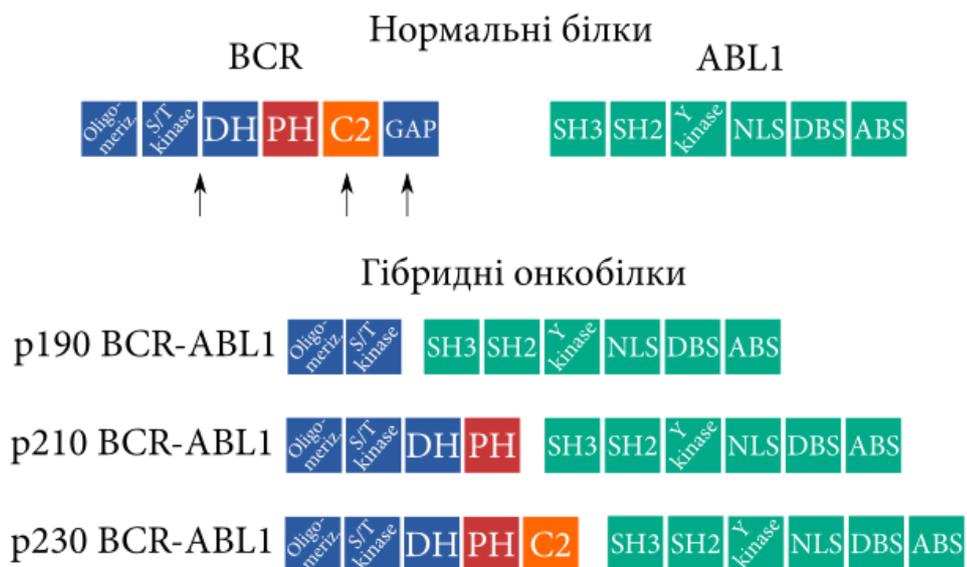


Рис. 1.2. Доменні структури нормальних BCR та ABL1, а також різних варіантів BCR-ABL1

Хоча DH-домени в інших білках часто діють як фактори обміну гуанінових нуклеотидів (Guanine Nucleotide Exchange Factor, GEF) для ГТФаз родини Rho, структурні та функціональні дослідження показують, що DH-домен BCR не проявляє GEF-активності для RhoA, Cdc42 або Rac1 *in vivo* або *in vitro* (55,56). Однак деякі дані свідчать про те, що в певних контекстах BCR може функціонувати як фактор обміну для Cdc42, але це не його основна чи основна активність (57).

Домен білка, що активує ГТФазу (GTPase-activating protein, GAP), BCR розташований у його С-кінцевій області та є висококонсервативним серед білків, пов'язаних з BCR, таких як ABR та n-хімерин (58–60). Цей домен специфічно діє на членів родини Rho малих ГТФаз, проявляючи сильну активність щодо Rac1, Rac2 та Cdc42, але не щодо RhoA, Rap1A або Ha-Ras (59–62). GAP-домен містить три висококонсервативні послідовні блоки, необхідні для його каталітичної активності. Мутаційний аналіз показує, що деякі залишки є критичними для активації ГТФази, тоді як інші важливі для зв'язування Rac, але не для каталізу (63). Домен BCR GAP прискорює гідроліз ГТФ, зв'язаного з білками Rac, перетворюючи їх з активного (зв'язаного з ГТФ) у неактивний (зв'язаний з ГДФ) стан, таким чином знижуючи регуляцію сигналізації Rac (58,61,62). У макрофагах втрата BCR (та його гомолога Abr) призводить до стійкої активації Rac, що призводить до зміненої морфології клітин, посилення рухливості та посилення фагоцитозу. Ці ефекти зникають шляхом повторного введення функціональних GAP-доменів, що підтверджує їхню роль як негативних регуляторів Rac *in vivo* (62). Активність GAP-домену BCR модулюється шляхом прямої взаємодії з RhoGDI α , який зв'язується з GAP-доменом і запобігає його перетворенню Rac-GTP на Rac-GDP. Ця взаємодія є взаємовиключною зі зв'язуванням Rac-GTP, забезпечуючи механізм динамічної регуляції GAP активності (64)

1.1.6. PH домен білка BCR. PH (від Pleckstrin-homology) домени зустрічаються у різних білках. Для багатьох із них добре охарактеризована здатність зв'язуватись з фосфоліпідами клітинних мембран саме за посередництва PH домена (65).

Для PH домена білка BCR була встановлена третинна структура методом рентгенівської дифракції на кристалах домена (Рис 1.3.). Вона відповідала канонічній будові PH доменів, в основі якої є β -сендвіч. Чотири N-кінцеві β -ланцюги упаковані напроти трьох-ланцюгового β -листка, після якого розміщена довга C-термінальна α -спіраль (55,66)

Для цього домена була експериментально виявлена здатність зв'язуватись

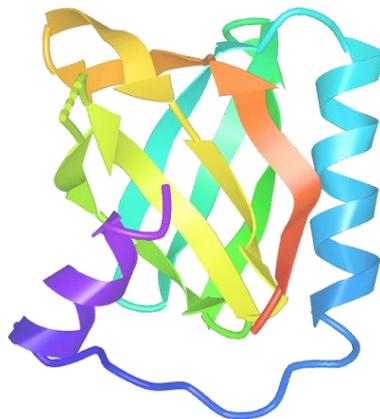


Рис. 1.3. Третинна структура PH домена білка BCR

з фосфоліпідами. Попередні дослідження у відділі молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України продемонстрували зв'язування з фосфатидилінозитол 3-фосфатом (PI(3)P), фосфатидилінозитол 4-фосфатом (PI(4)P), фосфатидилінозитол 5-фосфатом (PI(5)P). Крім цього виявили потенційних білків-кандидатів по взаємодії з PH доменом (5). Дана робота є логічним продовженням згаданих досліджень та спрямована на можливе підтвердження взаємодії PH домена з FNBP1, SMC1A та HSPB1.

1.1.7. C2 домен білка VCR. Типові C2 домени – це білкові модулі розміром приблизно 130 амінокислотних залишків. Вперше C2 домен було описано для протеїнкінази C, але тепер вони виявлені в широкому спектрі еукаріотичних сигнальних білків. Ці домени вирізняються своєю здатністю зв'язувати іони Ca^{2+} , фосфоліпіди та різні внутрішньоклітинні білки, опосередковуючи важливі процеси, такі як мембранний транспорт, ліпідна сигналізація та регуляція фосфорилування білків. Хоча функція багатьох доменів C2 залежить від Ca^{2+} , проте деякі еволюціонували таким чином, що вони є незалежними від наявності іонів кальцію (67–69).

Домени C2 зазвичай утворюють структуру у вигляді восьмиланцюгового β -сендвічу. Зв'язування Ca^{2+} відбувається в чашоподібному заглибленні, утвореному вільними петлями цього мотиву. Вирівнювання послідовностей та структурні дослідження виявили два різні топологічні варіанти серед C2 доменів, які відрізняється тим, як укладені β -ланцюги між собою та де знаходяться петлі, які можуть брати участь у зв'язуванні Ca^{2+} (рис. 1.4.) (67,68,70).

C2 домени діють як модулі стикування з мембранами, направляючи білки до поверхні мембран у відповідь на Ca^{2+} сигнали. Афінність та кінетика асоціації з мембранами варіюють між C2 доменами різних білків, що відображає їхню адаптацію до специфічних сигнальних ролей. Наприклад, C2 домен цитозольної фосфоліпази A2- α демонструє вищу чутливість до Ca^{2+} та повільнішу асоціацію з мембранами порівняно з доменами протеїнкінази C- β та синаптотагміну-IA, які потребують вищих концентрацій Ca^{2+} та асоціюються швидше. Механізми зв'язування з мембранами включають як гідрофобні, так і електростатичні взаємодії, причому необхідна кількість іонів кальцію та природа зв'язування ліпідів відрізняються між доменами (69,71).

Межі C2 домену в білку VCR визначаються по-різному в різних базах даних. 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.. Тривимірна структура цього

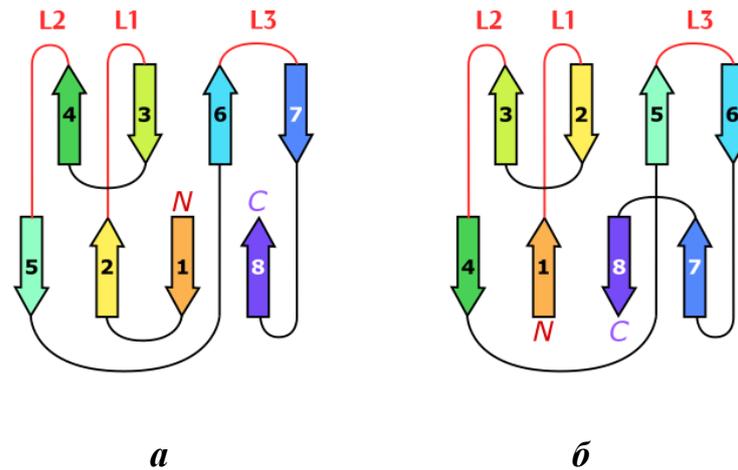


Рис. 1.4. Різні типи топології C2 доменів. *a* – I тип топології, *б* – II тип топології, L1, L2, L3 – петлі, що можуть брати участь у зв'язуванні іонів кальцію. Адаптовано до (67,68,70)

домену не є експериментально встановленою, а особливості функціонування його в складі BCR також є не дослідженими.

1.1.8. Злиття генів *BCR-ABL1* та його зв'язок з онкогематологічними захворюваннями. Гібридний ген *BCR-ABL1* є результатом транслокації $t(9;22)(q34;q11)$, відомої як Філадельфійська хромосома, і є ключовою ознакою хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ), а також зустрічається при гострій лімфобластній лейкемії (ГЛЛ) та, рідко, при гострій мієлоїдній лейкемії (ГМЛ). Злиття призводить до конститутивної активності тирозинкінази ABL1 в складі химерного білка BCR-ABL1. Ця активність стимулює лейкемогенез (31,72,73). Лейкемії, при яких спостерігається наявність цієї перебудови ще позначають як Ph'-позитивні, що є скороченням від Philadelphia chromosome.

ХМЛ – це клональне мієлопроліферативне захворювання, що виникає внаслідок неопластичної трансформації в плюрипотентній стовбуровій клітині. Воно характеризується наявністю кількох стадій: хронічної фази та фази гострої трансформації або бластної кризи. Хронічна фаза може тривати різний період часу від кількох місяців до кількох десятків років, далі вона прогресує в бластну кризу, що пов'язують з появою додаткових вторинних мутацій та перебудов. Для цього захворювання наявність філадельфійської хромосоми є основною молекулярною ознакою (31). При В-клітинній гострій лімфобластній лейкемії

транслокація $t(9;22)$ трапляється зрізною частотою у різних вікових категорій: у дітей - 3–5%, у дорослих - 25–30% (31,74).

Цікавим є те, що описані різні варіанти перебудов *BCR-ABL1*, які відрізняються розміщенням точок розривів у генах (рис. 1.1.). В гені *ABL1* розриви зазвичай відбуваються між 1 та 2 екзонами, хоча зрідка виявляють і розриви між 2 та 3. Для гена *BCR* загалом виділяють 3 окремі регіони можливих розривів. При цьому в результаті утворюються різні за розміром химерні онкопротеїни *BCR-ABL1*, які відрізняються величиною *BCR* частини (рис. 1.2.) (31,75).

До так званого мажор регіон розриву (*M-BCR*) відносять розриви між 13 та 14 екзонами *BCR* (e13a2, раніше відомий як b2a2) або розриви між 14 та 15 екзонами (e14a2, раніше відомий як b3a2). На великій міжнародній вибірці було показано, що e14a2 траплявся частіше (62,1%), ніж e13a2 (37,9%) (76). Ці розриви дають в результаті варіант білка *BCR-ABL1* який позначають як p210. Ці варіанти характерні для ХМЛ і належать до найбільш поширених (76–79).

Розрив у гені *BCR* між 1 та 2 екзоном (транскрипт e1a2) позначають як міног регіон розриву (*m-BCR*). Злиття такого варіанту призводить до утворення білка *BCR-ABL1* меншого розміру, який відомий як p190. Він частіше зустрічається при ГЛЛ та рідко при ХМЛ (31,72,73).

Розрив у ще одному регіоні мікро (μ *BCR*) призводить до формування варіанту e19a2, що є результатом злиття 19 екзону *BCR* та 2 екзону *ABL1*. Цей варіант дає найбільший за розміром гібридний білок p230. Він трапляється вкрай рідко. Раніше можна було знайти приписування цієї перебудови хронічній нейтрофільній лейкемії, але зараз це захворювання характеризують, як Ph⁻-негативне відповідно до прийнятих стандартів. Якщо ж реєструють картину схожу на хронічну нейтрофільну лейкемію, але Ph⁻-позитивну, то говорять про ХМЛ з нейтрофілією, або нейтрофільну ХМЛ (4,80–83).

Якщо розглядати ці найпоширеніші варіанти білка *BCR-ABL1*, то варто відмітити різницю в тому, які домени *BCR* представлені в остаточному варіанті онкобілка (рис. 1.2.). Так, у найкоротшому p190 відсутні DN, PH та C2 домени

BCR. У р210, на відміну від р230, відсутній С2 домен. Таким чином розуміння ролі цих доменів в нормальному BCR може служити підґрунтям для розуміння різниці між цими варіантами гібридних білків при різних Ph⁺-позитивних лейкеміях.

1.2. Білок FNBP1

1.2.1. Структура гена, що кодує FNBP1, та його експресія.

Білок FNBP1 (Formin binding protein 1, Формін зв'язувальний білок 1)), також відомий під назвою FBP17, кодується геном, який розташований у людини на короткому плечі 9-ї хромосоми (локус 9q34.11). Відповідно, до даних розміщених в базі NCBI Gene даний ген має 19 екзонів (84).

Експресія цього гена виявлена на рівні РНК у багатьох ембріональних тканинах та органах (84,85). Секвенування РНК нормальних тканин людини також продемонструвало експресію цього гена в усіх досліджуваних тканинах з дещо підвищеним рівнем у лімфатичних вузлах, селезінці та апендиксі (10,84). За даними The Human Protein Atlas project (86,87) експресія виявлена в практично усіх тканинах з підвищеним рівнем у лімфоїдній тканині (88). Причому тут оцінка проводилась не тільки на рівні РНК, але і підтверджувалась наявність білка за допомогою специфічних антитіл. Субклітинна локалізація білка була пов'язана з плазматичною мембраною та везикулами (88).

Різні бази даних дають різну кількість відомих варіантів мРНК, що транскрибуються з цього гена. Наприклад, база Uniprot надає інформацію про 5 транскрипційних варіантів та відповідних ним ізоформ білка (89), у Ensembl вказані 13 варіантів (90), а в базі NCBI Gene представлено 25 (84). В основі цього різноманіття лежить альтернативний сплайсинг. Розмір білків, що трансклюються з цих варіантів відрізняються за розміром. Канонічним транскрипційним варіантом вважається той, на основі якого синтезується білок FNBP1 розміром 617 а.з.

1.2.2. Доменна структура білка FNBP1. FNBP1 протеїн має в своєму складі кілька яскраво виражених доменів та важливих регіонів, що відіграють провідну роль у реалізації його функцій в клітині (рис. 1.5). Відповідно до даних NCBI Gene (84), для канонічного білка розміром 617 а.з., починаючи N-кінця поліпептидної послідовності, доменна структура виглядає таким чином: від початку і до 264 а.з. знаходиться F-BAR домен, починаючи з 407 та закінчуючи 483 а.з. розміщений домен HR1, на C-кінці білка розташований SH3 домен в діапазоні 553-608 а.з.

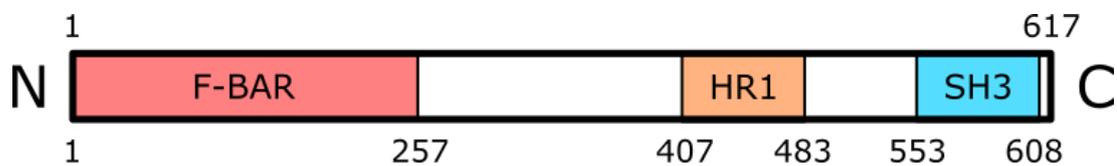


Рис. 1.5. Доменна структура білка FNBP1

Домен F-BAR, також відомий за назвою EFC (розширений FCH домен, extended FCH), належить до великої родини доменів BAR, що зустрічаються у багатьох білках еукаріот. Функція цих доменів пов'язана з реорганізацією мембран, вони можуть зв'язуватись з ліпідами та сприяти димеризації (91). Вивчення структури F-BAR домену білка FNBP1 виявило, що він складається з п'ятих α -спіралей: однієї короткої, трьох довгих та ще однією короткої. Фактично початок цього домену відповідає структурі класичного FCH домена, розширеною версією якого він є. В кристалах він формує злегка вигнутий димер у вигляді спірального пучка довжиною близько 220 Å, який утворюється завдяки взаємодії кінець до кінця між трьома довгими α -спіралями одно білка та такими ж спіралями іншого (92). Формування такого димеру, що дозволяє білку FNBP1 відчувати зміни напруги клітинної мембрани в реальному часі, а також сприяє формуванню вигнутих мембранних структур. Димеризація забезпечує стабільне зв'язування білка з криволінійними мембранами, що є ключовим для його ролі у регуляції мембранної динаміки, активації полімеризації актину та формуванні клітинних випинань (ламеллоподій, філаподій, інваподій) (93). Для F-BAR домену

білка FNBP1 було встановлено взаємодію з фосфоліпідами, зокрема фосфатидилсерином та фосфатидилінозитол 4,5-біфосфатом (94).

HR1 (Homology Region 1) домени за структурою формуються з антипаралельних спіралей (coiled-coil). HR1 домени відповідають за взаємодію з активними формами Rho-сімейства GTPаз, зокрема з Cdc42, що є ключовим регулятором актинового цитоскелету. Через цей домен FNBP1 може зв'язуватися з активованими Rho-GTPазами, що дозволяє білку брати участь у регуляції динаміки актинового цитоскелету, клітинної міграції, ендоцитозу та формуванні мембранних структур (95,96).

SH3 домени є консервативними і складається з приблизно 50-60 амінокислот, формуючи компакту структуру, що розпізнає пролін-збагачені пептидні послідовності. Типова структура SH3 доменів характеризується компактним β -циліндром (β -barrel), який складається з п'яти або шести β -ланцюгів, організованих у дві щільно упаковані антипаралельні β -листи (97). Ця структура утворює стабільний каркас, який забезпечує специфічне зв'язування з пептидами, багатими на пролін, зазвичай із мотивом RxxP (де P - пролін, x - будь-яка амінокислота) (98). Серед білків, для яких показана взаємодія з SH3 ділянкою FNBP1, були виявлені динамін-1 (99), FasL (100), SHIP1 (101).

Окрім вищеописаних доменів також варто відмітити регіон в позиції 515-520 а.з. з амінокислотною послідовністю RESPDG відповідальний за взаємодію з танкіразою (102).

1.2.3. Функції білка FNBP1 в клітині. FNBP1 — це багатофункціональний білок, який бере участь у кількох ключових клітинних процесах, головним чином через регуляцію актинового цитоскелету та динаміки мембран.

На клітинному рівні FNBP1 є ключовим для ендоцитозу, регуляції форми клітини та морфогенезу, індукуючи кривизну мембрани та полімеризацію актину. N-кінцевий EFC-домен FNBP1 забезпечує зв'язування з мембраною та її деформацію, тоді як FNBP1 може активувати шлях WASP-Arp2/3-актин, що сприяє полімеризації актину та руху клітини. Цей механізм дозволяє FNBP1

координувати формування мембранної кривизни і цитоскелетні перебудови, необхідні для клітинної міграції. При цьому його пригнічення (knockdown) призводить до значних змін у морфології клітин (103). FNBP1 та його родичі мають консервативні домени (FCH, FBH, HR1, SH3), які забезпечують взаємодію з актиновим цитоскелетом, білками родини Rho, формін-гомологічними білками та білками родини WASP. Ці взаємодії визначають роль FNBP1 як білка-основи (скелетного білка), що інтегрує динаміку цитоскелету з сигнальними шляхами, які регулюють форму клітини, її полярність та рухливість (104).

FNBP1 є невід'ємною складовою комплексу актинового цитоскелету, що є чутливим до Wnt-сигналіngu, та бере участь у формуванні внутрішньоклітинних трубчастих структур. Ці функції є життєво важливими для міграції клітин і морфогенезу. У розвитку хребетних FNBP1 взаємодіє з Daam1 для регуляції неканонічного Wnt-сигналіngu, що критично для гастрюляції та правильного ембріонального розвитку. Синергічна взаємодія FNBP1 і Daam1 підкреслює їхню важливість у клітинному русі та формуванні тканин (105).

Останні дослідження виявили, що FNBP1 є рецептором гольджіфагії, який реагує на стрес, пов'язаний із нестачею поживних речовин, у нейронах. Під час голодування FNBP1 локалізується на фрагментованих мембранах апарату Гольджі та взаємодіє з LC3B, сприяючи захопленню фрагментів Гольджі в аутофагосоми. Ця дозволяє забезпечувати підтримання гомеостазу нейронів за умов метаболічного стресу, пов'язуючи FNBP1 із селективною аутофагією та оновленням органел (106).

1.2.4. Зв'язок білка FNBP1 з раковими та іншими захворюваннями.

Існують дослідження, які показали, що FNBP1 має підвищену експресію у клітинах раку грудей як на рівні мРНК, так і білка. Ця підвищена експресія сприяє формуванню інвадоподій у інвазивних ракових клітин (107).

FNBP1 дійсно залучений у виживання ракових клітин, зокрема у випадках раку шийки матки та шлунка. Він підтримує активність фокальної адгезійної кінази (ФАК) і активує сигнальний шлях PI3K/АКТ/mTOR, що сприяє проліферації клітин та їхній резистентності до апоптозу. У агресивних підтипах

шлункового раку експресія FNBP1, під контролем транскрипційного фактора Sp1, посилює тривимірну рухливість клітин і їхню інвазивність. Крім того, рівень експресії FNBP1 корелює з інфільтрацією імунних клітин та експресією імунних контрольних точок у різних видах раку, що свідчить про його роль у уникненні імунної відповіді пухлиною та потенціал як прогностичного біомаркера (93,108,109).

Хромосомна аберація за участю гена FNBP1 виявляється при гострих лейкеміях у вигляді транслокації t(9;11)(q34;q23) з геном KMT2A/MLL1. Відносно низька частота появи химерного білка KMT2A/MLL1-FNBP1 в гострих лейкеміях може відображати обмежену здатність його індукувати клітинну трансформацію (110)

1.3. Білок SMC1A

1.3.1. Ген *SMC1A* та його експресія. Ген *SMC1A* розміщений на короткому плечі X хромосоми (Xp11.22), в ділянці, яка уникає інактивації (111–113). Він складається з 26 екзонів. На основі нього утворюються 2 відомих транскрипційних варіанти, короткий та довгий. Короткий варіант відрізняється від довгого в 5' UTR ділянці та у кодувальній області. Ці відмінності приводять до ініціації трансляції з наступного AUG-кодону і утворення білка, що є з коротшим з N-кінця (114).

Експресія даного гена виявлена та підтверджена на рівні мРНК та білка в усіх типах клітин без особливої тканинної специфічності (10,85,115). Цю картину можна пояснити провідною роллю білка SMC1A в підтримці стабільності хромосом, що є важливим для всіх клітин. При цьому слід зазначити про виявлену підвищену експресію *SMC1A* при колоректальній (116,117) та гепатоцелюлярній (118) карциномах.

1.3.2. Структура та функції білка SMC1A. Білок SMC1A є поліпептидом довжиною 1233 а.з. (рис. 1.6.*a*) Він належить до групи білків SMC (structural maintenance of chromosomes – структурна підтримка хромосом), до якої належать також SMC2, SMC3, SMC4. Ці білки є високо консервативними АТФ-азами. Кожен SMC самозгортається шляхом утворення антипаралельної спіральної котушки (coiled coil) та складається навпіл таким чином, що N- та C-кінці білка зближаються та утворюють АТФ-зв'язувальний головний домен (head) (рис. 1.6.*б*). У місці складання формується шарнірний домен (hinge), який в базі Uniprot визначається як послідовність в діапазоні 515-629 а.з. (119)

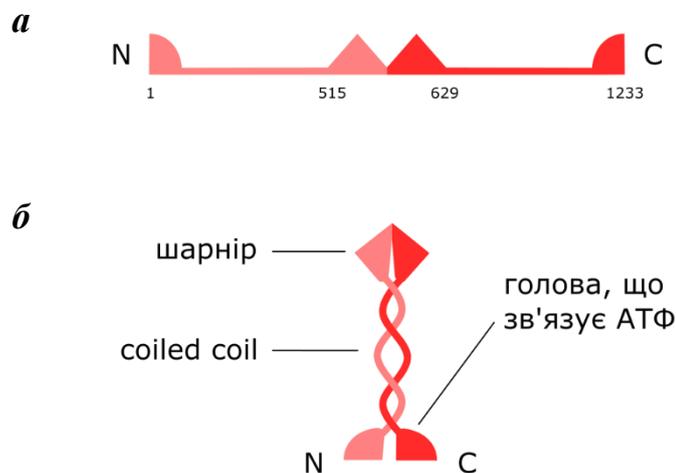


Рис. 1.6. Структура білка SMC1A. *a* – у вигляді поліпептидного ланцюга, *б*– в нативній конформації

SMC1A є одним з компонентів когезинового комплексу. Когезин відіграє ключову роль у когезії сестринських хроматид, експресії генів та репарації ДНК. Цей білковий комплекс, який окрім SMC1A включає також SMC3, RAD21 та STAG (STAG1 або STAG2). Когезин, витрачаючи АТФ, формує петлі ДНК у геномі в інтерфазі, що важливо для належної просторової організації та регуляції генів (120). Часто формування таких петель залежить від наявності CCCTC мотивів, місцем прикріплення білків CTCF (CCCTC-binding factor). Якщо CTCF зв'язаний з відповідним мотивом в геномі, в цій точці відбувається зупинка когезину в процесі утворення петлі. Таким чином, петля по суті формується між

двома такими сайтами, де когезин було зупинено (121,122). Шарнірна ділянка SMC1A разом зі STAG є ключовими при взаємодії когезину з CTCF (123,124).

1.3.3. Зв'язок SMC1A з захворюваннями людини. *SMC1A* часто надмірно експресується або мутує при кількох видах раку, включаючи колоректальний рак (116,117), гепатоцелюлярну карциному (118), рак молочної залози та саркому. Надмірна експресія або аберантне фосфорилування SMC1A сприяє проліферації, міграції та агресивним фенотипам ракових клітин. При колоректальному раку надмірна експресія та мутація *SMC1A* призводять до хромосомної нестабільності та онкогенезу, тоді як пригнічення SMC1A, особливо в поєднанні з таргетною терапією, такою як бевацизумаб, є терапевтично перспективним (125). При гепатоцелюлярній карциномі та раку молочної залози фосфорильований SMC1A корелює з прогресуванням пухлини, вищим ступенем злості та метастазуванням, а також пов'язаний з поганим прогнозом при саркомі (116,126–128).

Ряд мутацій в гені *SMC1A* асоційовані з синдромом Корнелії де Ланге (129–131). Цей синдром є домінантним спадковим захворюванням, що характеризується мультисистемними аномаліями, включаючи дисморфію обличчя, різними дефектами, аномаліями шлунково-кишкової, серцевої, сечостатевої та інших систем, затримкою росту та нейророзвитку (131–134).

1.4. Білок HSPB1

1.4.1. Ген *HSPB1* та його експресія. Ген *HSPB1* розміщений на 7 хромосомі (7q11.23) та має 3 екзони (135). Кодує цей ген білок HSPB1 (відомий також як Hsp27), що належить до родини малих білків теплового шоку (Heat shock protein, Hsp). Загалом цей ген експресується у всіх клітинах та тканинах, з дещо вищим рівнем у стравоході та шкірі, зокрема в плоскому епітелії (10,135,136).

У нормальних клітинах і тканинах HSPB1 зазвичай представлений на базальних рівнях і його рівень може підвищуватись у відповідь на клітинний

стрес, такий як оксидативне пошкодження або запалення, для захисту клітин від пошкодження та підтримки клітинної функції. Він бере участь у різних клітинних процесах, включаючи захист від оксидативного стресу, регуляцію апоптозу та підтримку гомеостазу білків (137–139)

1.4.2. Структура білка HSPB1. Білок HSPB1 довжиною 205 а.з. Він має консервативну доменну структуру. Альфа-кристаліновий домен (Alpha-Crystallin Domain, ACD) - це центральний, структурний домен білка HSPB1, який є високо консервативним серед малих білків теплового шоку (sHSPs). Цей домен має імуноглобуліноподібну складку і є ключовим для димеризації та олігомеризації, що є необхідними для функціонування шаперона. ACD забезпечує утворення димерів через симетричне антипаралельне спарювання β -ланцюгів, формуючи розширений інтерфейс β -листіків (140–142).

N-термінальний регіон (N-terminal region, NTR) - має внутрішньо невпорядковану структуру та становить майже половину послідовності HSPB1. NTR є дуже динамічним, приймає гетерогенні конформації та бере участь у регуляторних взаємодіях з ACD. Специфічні мотиви в NTR взаємодіють з борозенками на ACD, модулюючи активність шаперону та збірку олігомеру (140,143–145).

C-термінальний регіон (C-terminal region CTR) також є невпорядкованим та дуже динамічним. Він містить мотиви, що взаємодіють з ACD та сприяють стабільності олігомерів та взаємодії з білками, які обслуговує шаперон. CTR, як і NTR, еволюціонує швидше, ніж ACD, але містить консервативні мотиви, необхідні для функціонування (140,143).

HSPB1 утворює олігомери, причому ACD є основним драйвером димеризації, а NTR/CTR опосередковує збірку вищого порядку та динамічні перебудови у відповідь на клітинний стрес (141,143,146). HSPB1 може формувати олігомерні структури до 800 кДа. При чому зміщення в сторону менших олігомерів відбувається за рахунок фосфорилування білка по сериновим залишкам (147).

1.4.3. Роль HSPB1 у патології. Хоча HSPB1 експресується в багатьох нормальних тканинах, його експресія часто змінюється при захворюваннях. Наприклад, його експресія знижена в хондроцитах остеоартриту та склеротичних судинах, але підвищена у відповідь на гострий стрес або при деяких видах раку, де він може сприяти прогресуванню захворювання або стійкості до терапії (148–151).

Внутрішньоклітинний HSPB1 відіграє антиапоптичну роль, а також, в якості шаперона, захищає від агрегації неправильно сформовані білки. Такі ефекти можуть мати важливе значення у розвитку ряду патологій. Для ряду онкологічних захворювань гіперекспресія HSPB1 є навіть негативним прогностичним фактором (рак яєчника, простати та молочної залози) (152). Виявлені випадки, коли у пацієнтів з ХМЛ, нечутливих до традиційної терапії, було виявлено дуже активний фосфорильований HSPB1 (153).

1.5. CRISPR-Cas як інструмент до нових видів терапій

Система CRISPR-Cas – це адаптивні імунні механізми, що зустрічаються у бактерій та архей, що забезпечують захист від вторгнення генетичних елементів, таких як бактеріофаги. Система працює через три основні етапи: адаптація (інтеграція чужорідної ДНК як спейсерів у масив CRISPR), біогенез crRNA (формування на основі масиву CRISPR направляючих РНК) та інтерференція (цілеспрямоване знищення відповідних чужорідних нуклеїнових послідовностей) (154,155). Білки Cas, зокрема Cas9, Cas12 та Cas13, керуються молекулами РНК для розпізнавання та розщеплення специфічних послідовностей ДНК або РНК, причому розпізнавання мішені часто вимагає так званої послідовності PAM (protospacer adjacent motif) (154,156,157).

Можливість штучно спрямовувати систему CRISPR-Cas здійснила революцію в редагуванні геному, діагностиці та регуляції генів. Cas9 та його варіанти широко використовуються для редагування генів у різних організмах, тоді як Cas12 та Cas13 дозволили швидке та чутливе виявлення нуклеїнових

кислот для діагностики, включаючи застосування для point-of-care рішень (158–161). Окрім редагування, інструменти CRISPR-Cas були розроблені для регуляції транскрипції, епігенетичної модифікації та візуалізації нуклеїнових кислот (159–161). Однак, залишаються і деякі проблеми в реальному застосуванні, наприклад, позамішеневі (off-target) ефекти, імунні реакції та потреба в ефективніших системах доставки (161,162).

В даній роботі CRISPR-Cas система становила інтерес перш за все як інструмент редагування геному, зокрема завдяки потенційній можливості виправлення хромосомних транслокацій на прикладі філадельфійської хромосоми. Відомі приклади систем CRISPR-Cas, які були розроблені для цілеспрямованого впливу на ген злиття *BCR-ABL1*. Шляхом розробки направляючих РНК, які розпізнають унікальну область злиття, CRISPR/Cas9 може вибірково порушувати онкогенний ген *BCR-ABL1*, зберігаючи при цьому нормальні гени *BCR* та *ABL1*, мінімізуючи негативні ефекти та зберігаючи здорові клітини (163–165). Прибирання *BCR-ABL1*, опосередкована CRISPR/Cas9, у клітинних лініях призводила до швидкого апоптозу та втрати онкогенного потенціалу, як *in vitro*, так і в ксенотрансплантованих моделях. Відредаговані клітини демонстрували підвищений апоптоз та знижений або відсутній ріст пухлини, що демонструє критичну залежність лейкемічних клітин від гена злиття *BCR-ABL1* (164,166). Цікаво, що в мишачих моделях Ph⁺-позитивної гострої лімфобластної лейкемії з мутацією T315I (резистентної до більшості інгібіторів тирозинкінази ABL1), націлення CRISPR/Cas9 на *BCR-ABL1* ефективно уповільнювало прогресування захворювання, що свідчить про перспективну користь застосування проти лікарсько-резистентної форм (164).

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Обладнання, використане в роботі

Центрифуга з охолодженням Eppendorf Epp 5415R, конфокальний флуоресцентний мікроскоп Carl Zeiss LSM 510 Meta (Німеччина), конфокальний флуоресцентний мікроскоп Leica SP8 (Німеччина), Трансілюмінатор Vilber Lourmat (США), спектрофотометр Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, камера для горизонтального електрофорезу в агарозному гелі “Helicon” (Росія), джерело живлення для камери електрофорезу “Эльф-4” (“ДНК-технология”, Росія), шафа біологічної безпеки II класу ESCO (Сінгапур), CO₂ інкубатор Binder (Німеччина), ампліфікатор для ПЛР – Eppendorf Mastercycler Personal 5332 (США).

2.2. Розчини та реагенти, використані в роботі

Для роботи з ДНК. Розчин для ресуспендування при лужному лізисі: 50 мМ глюкози, 25 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 10 мМ EDTA; розчин для лізису при лужному лізисі: 1% SDS, 0,2 М NaOH; розчин для нейтралізації при лужному лізисі: 3М ацетату калію, 14% льодяної оцтової кислоти; розчин р неіонними детергентами (NID): 5% сахарози, 50 мМ Tris pH 8,0, 30 мМ EDTA, 0,75М NH₄Cl, 0,5% Triton X-100, 100 мкг/мл лізоциму, 25 мкг/мл РНКазы А; розчин для селективної преципітації високомолекулярної РНК: 4,2 М CaCl₂; розчин для селективної преципітації низькомолекулярної РНК: 20% PEG6000, 0,5М NaCl;

Розчини для очищення ДНК на скловолоконних фільтрах. Адсорбційний розчин: 5М гуанідин тіоціанат, 50мМ MES pH 5,5, 20мМ EDTA pH 8,0, 0,5% Triton X-100, 5мМ крезоловий червоний; розчин для промивання: 10мМ Tris pH

7,5, 1мМ EDTA, 100мМ NaCl, 50% етанол; скловолоконні фільтри GF/C (Whatmann, Велика Британія).

Буфер TAE: 40мМ Tris основного, 20мМ оцтової кислоти, 1мМ EDTA.

10-кратний реакційний буфер для ПЛР; 25 мМ розчин MgSO₄; 2мМ розчин dNTP: 2мМ dATP, 2мМ dCTP, 2мМ dGTP, 2мМ dTTP;

Реакційний буфер для T4 PNK: 70 мМ Tris-HCl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ ATP, 5 мМ DTT, pH 7,6;

Реакційний буфер для T4 ДНК лігази: 50 мМ Tris-HCl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ ATP, 10 мМ DTT, pH 7,5.

Для роботи з білками. Буфер для лізису: 50мМ NaH₂PO₄, 300мМ NaCl, 10мМ імідазолу, pH 8,0, 1мМ PMSF, 100 мкг/мл лізоциму. Буфер для промивання: 50мМ NaH₂PO₄, 300мМ NaCl, 20мМ імідазолу, pH 8,0. Буфер для елюції: 50мМ NaH₂PO₄, 300мМ NaCl, 250мМ імідазолу, pH 8,0.

Буфер для елюції при очищенні білків з GST: 50мМ Tris основного, 10мМ глутатіон, pH 8,0. Буфер PBS: 150мМ NaCl, 2мМ KCl, 5,2 мМ Na₂HPO₄, 1,5мМ KH₂PO₄, pH 7,4. Буфер TBST 10 кратний: 9% NaCl, 0,1М Tris-HCl, 1% Tween 20. Розчин для блокування: 1% бичачого сироваткового альбуміну (BSA) (Sigma-Aldrich, Німеччина) в PBS.

Для роботи з культурами клітин та для мікроскопії. Trypsin-EDTA (Biowest, Південна Корея). Заклучне середовище для мікроскопії: 10% Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich, Німеччина), 2,5% DABCO (Sigma-Aldrich, Німеччина), 25% гліцерину, 100 мМ Tris-HCl pH 8,5. Розчин для фіксації клітин: 4% параформальдегід (Sigma-Aldrich, Німеччина) в PBS. Розчин для пермеабілізації клітин: 0,3 % Triton-X100 в PBS.

2.3. Поживні середовища для вирощування бактерій

Для загальних потреб вирощування різних штамів E. coli використовували рідке поживне середовище LB (Luria Broth): 1% Vacto Tryptone (Difco, США),

0,5% Екстракт дріжджів (Nofroxx, Німеччина), 1% NaCl. Тверде поживне середовище LB: 2% агар у LB.

2.4. Поживні середовища для вирощування культур еукаріотичних клітин

DMEM (Biowest, Південна Корея); DMEM повний: DMEM + 10% фетальної бичачої сироватки (Biowest, Південна Корея); DMEM без фенолового червоного для мікроскопії живих клітин з додаванням 20 мМ HEPES (Biowest, Південна Корея); RPMI (ThermoFisher Scientific, США); 1000-кратний розчин антибіотиків для додавання в середовище для клітин ссавців: 50000 од./мл пеніциліну, 100 мг/мл стрептоміцину;

2.5. Використані ферменти та буфери для їх роботи

Pfu-поімераза (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.

2.6. Антитіла та барвники, використані в роботі

Первинні антитіла. Кролячі антитіла проти гемаглютиніну (anti-НА, H6908, Sigma-Aldrich, США), кролячі антитіла проти глутатіон-S-трансферази (anti-GST, G7781, Sigma-Aldrich, США), моноклональні мишачі антитіла проти полігістидину (anti-His, H1029, Sigma-Aldrich, США), мишачі моноклональні антитіла проти FNBP1 (sc-515414, Santa Cruz Biotechnology, США), кролячі поліклональні антитіла проти BCR (PA5-17709, ThermoFisher Scientific, США).

Вторинні антитіла. Протикролячі антитіла кон'юговані з пероксидазою хрому (A6154, 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).

Барвники. DAPI (D9542, SigmaAldrich, США), пропідій йодид (P1304MP, Sigma Aldrich, США).

2.7. Вектори та генетичні конструкції

Генетичні конструкції pET32a-PH та pEGFP-PH було створено Д. Мірошниченко під час попередніх досліджень у відділ молекулярної генетики Інституту молекулярної біології та генетика НАН України (5).

Генетична конструкція, що кодує повнорозмірний p230 *BCR-ABL1* була люб'язно надана N. Heisterkamp (Children's Hospital of Los Angeles, USA).

Конструкція FBP17-pmCherryC1, що містить послідовінсть, що кодує повнорозмірний FNBP1, був дарунком від Christien Merrifield (Addgene #27688) (167).

Вектори для експресії в еукаріотичних клітинах pJ3H та pJ3H-FBP17, що кодує повнорозмірний FNBP1, були подаровані Pontus Aspenstrom, Каролінгський інститут, Швеція.

Вектор pOTB7-Hsp27, що містив послідовність, що кодує HSPB1 (відомий також як Hsp27), був люб'язно наданий Анною Дубровською, Німеччина.

Вектори pET-28c-sumo, pET-42a та pGEX-4T-1 використовувались як базові вектори для створення генетичних конструкцій.

2.8. Штами *E. coli*, що використовувались в роботі

NEB Turbo. Даний штам використовувався для отримання плазмід в необхідних кількостях. Генотип: F' *proA*⁺*B*⁺ *lacI*^q Δ *lacZ*M15 *fhuA2* Δ (*lac-proAB*) *glnV galK16 galE15 R(zgb-210::Tn10)*Tet^S *endA1 thi-1* Δ (*hsdS-mcrB*)5.

TOP10. Штам походить від MC1061. Генотип: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80 *lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *ara* Δ 139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (*StrR*) *endA1* *nupG*

Rosetta(DE3)pLysS. Цей штам походить від BL21. Важливою особливістю є наявність плазмиди pLysSRARE, що кодує тРНК з рідкісними для прокариот кодонами AUA, AGG, AGA, CUA, CCC та GGA. Плазміда має ген стійкості до хлорамфеніколу, а також кодує T7 лізоцим. Генотип: F⁻ *ompT* *hsdS*_B(r_B⁻, m_B⁻) *gal dcm* (DE3) pLysSRARE (Cam^R).

ArcticExpress(DE3). Цей штам походить від BL21(DE3). Мета його створення це збільшення кількості розчинного рекомбінантного білка з правильною конформацією. Він адаптований для експресії та синтезу білка при низьких температурах. Для цього в цьому штамі присутні гени стійких до холоду шаперонінів *Cpn10* та *Cpn60* з психрофільної бактерії *Oleispira antarctica*. Ці шапероніни забезпечують фолдинг білків при +4–12°C.

2.9. Культури еукаріотичних клітин

293T. Модифікована версія лінії клітин НЕК 293, яка в свою чергу була отримана з ембріональних клітин нирок людини. В клітинах цієї лінії присутній T антиген SV40, що сприяє експресії векторів з SV40 промотором. Відзначається вищими рівнем трансфекції. Культура отримана з банку клітин відділу молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

K562. Культура мієлобластних клітин, що походить кісткового мозку хворого на хронічну мієлоїдну лейкемію. В цих клітинах присутня перебудова *BCR-ABL*. Клітинна лінія була взята з банку клітин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Е. Кавецького НАН України.

J774. Це клітинна лінія макрофагів, ізольована у 1968 році з асциту дорослої самки миші з саркомою ретикулярних клітин. Застосовується для вивчення зокрема процесів пов'язаних з фагоцитозом. Взято з банку клітинних ліній в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України.

2.10. Отримання компетентних клітин *E. coli* та їх трансформація плазмідною ДНК

Даний підхід для приготування хімічно компетентних клітин застосовували до всіх штамів *E. coli*, які використовувались в цій роботі. Культуру клітин вирощували у 50 мл. середовища LB (за необхідності з відповідним антибіотиком) протягом 4 годин при $+37^{\circ}\text{C}$ до досягнення оптичної густини $\text{OD}_{600} = 0,6$. Попередньо охолодивши культуру клітин на льоду протягом 10 хвилин, її осаджували центрифугуванням 20 хвилин при 2000g з охолодженням до температури $+4^{\circ}\text{C}$. Надосадову рідину зливали, а осад клітин обережно ресуспендували у 10 мл охолодженого розчину $0,1\text{M CaCl}_2$ та інкубували на льоду на 15 хвилин. Клітини центрифугували 20 хвилин при 2000g при $+4^{\circ}\text{C}$. Супернатант видаляли, а осад клітин ресуспендували в 2 мл охолодженого розчину $0,1\text{M CaCl}_2$ з 15% гліцерину. Витримавши 20 хвилин на льоду, клітини розфасовували по мікропробірках по 100 мкл і зберігали при -80°C або використовувались одразу для трансформації.

Аліквоту 100 мкл отриманих хімічно компетентних клітини *E. coli* розморожували на льоду протягом 10 хвилин, якщо вони зберігались при -80°C . Цей етап не був потрібен у випадку застосування щойно приготованих компетентних клітин. Плазмідна ДНК або лігазна суміш додавали до цих клітин з урахуванням того, щоб об'єм доданої ДНК не перевищував 10% об'єму суспензії клітин. Цю суміш інкувавали при $+4^{\circ}\text{C}$ на льоду протягом 30 хвилин. Після цього суміш ДНК з клітинами поміщали на водяну бану при $+42^{\circ}\text{C}$ на 90 секунд, а далі одразу повертали на лід на 1 хвилину. Наступним кроком було додавання 1 мл поживного середовища LB без антибіотиків та інкубування при $+37^{\circ}\text{C}$ протягом 1 години з постійним помішуванням. Клітини концентрували осадженням за допомогою центрифуги при 5000g протягом 5 хвилин. Отримані клітин після ресуспендування у 100 мкл свіжого LB висівались суцільним газоном на чашки Петрі з твердим середовищем LB з доданим у відповідній

Базова схема ПЛР полягала в 30 циклах, що складались з послідовних етапів при 94°C протягом 40 секунд, при температурі гібридизації праймерів (таблиця 2.1.) протягом 40 секунд та 72°C протягом 90 секунд. Після проходження циклів додатково був етап елонгації при 72°C протягом 2 хвилин.

2.11.2. Виділення плазмідної ДНК методом лужного лізису. Даний метод є адаптацією класичного методу лужного лізису (168,169). Бактерії *E. coli* з необхідною плазмідною вирошували на твердому поживному середовищі LB з додаванням селективного антибіотика, що відповідав резистентності, яка забезпечується самою плазмідною. Одиначну колонію, отриману після 18 годин культивування при +37°C, інокулювали у 50 мл рідкого поживного середовища LB з тим самим антибіотиком у відповідній концентрації. Культуру вирошували при +37°C з постійним струшуванням протягом 18 годин. Вирощену культуру осаджували центрифугуванням при 2000g протягом 20 хвилин. Після видалення надосадової рідини до осаду клітин додавали 2 мл розчину для ресуспендування. Після ресуспендування осаду суспензію охолодували 10 хвилин при +4°C на льоду. Далі додавали подвійний об'єм розчину для ресуспендування (4 мл) розчину для лізису. Після обережного перемішування витримували 5-10 хвилин при кімнатній температурі. Наступним етапом була нейтралізація лужного середовища шляхом додавання розчину для нейтралізації у об'ємі 3 мл (0,75 об'єму розчину для лізису). Обережно перемішували та витримували на льоду 10 хвилин. Для осадження ДНК до відфільтрованого через фільтрувальний папір нейтралізованого розчину додавали 0,6 об'єму ізопропанолу. Після перемішування проводили центрифугування при 2000g протягом 20 хвилин. Отриманий осад промивали 70% етанолом, додаючи його до осаду у об'ємі 0,1 від об'єму ізопропанолу, після чого центрифугували при 2000g протягом 5 хвилин. Прибравши зайву рідину, осад висушували при +37°C. Висушені осад розчиняли у дистильованій воді.

2.11.3. Виділення плазмідної ДНК з використанням неіонних детергентів. Для виділення невеликої кількості плазмід (до 5 мкг, мініпрепарат) використовували метод виділення за використанням неіонних детергентів (170). В 1-2 мл поживного середовища LB вирощували бактерії при +37°C при постійному струшуванні протягом 10-12 годин. Культуру центрифугували при 10000g протягом 5 хвилин. Прибравши надосадову рідину, до осаду клітин додавали 500 мкл розчину із неіонними детергентами (NID) та інтенсивно перемішували. Утворена суспензія інкубувалась на водяній бані при +65°C протягом 10 хвилин. Наступним етапом було центрифугування при 16000g протягом 40 хвилин. Осад видаляли, а до надосадової рідини додавали ізопропанол, в об'ємі 1:1. Після цього центрифугували при 16000g протягом 20 хвилин. Осад промивали 70% етанолу шляхом його додавання у об'ємі 1мл з наступним центрифугуванням при 16000g протягом 5 хвилин. Осад осушували при +37°C. Висушені осад розчиняли у дистильованій воді.

2.11.4. Очищення плазмідних векторів. Після виділення плазмідна ДНК потребувала додаткового очищення, зокрема від РНК. Для цього застосовували метод з використанням CaCl_2 та PEG6000/NaCl (171). До розчину з плазмідною ДНК додавали 1/2 об'єму 4,2М CaCl_2 , змішували до утворення осаду. Проводили центрифугування при 10000g протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Супернатант відбирався та осаджувався 0,6 об'єму ізопрапанолу з наступним центрифугуванням при 16000g протягом 20 хвилин при кімнатній температурі. Осад промивали 70% етанолом та сушили при +37°C, а потім розчиняли у дистильованій воді. На наступному етапі осаджували низькомолекулярну ДНК шляхом додавання в співвідношенні 1:1 розчину 20% PEG6000, 500 мМ NaCl. Після перемішування, центрифугували при 16000g протягом 20 хвилин при кімнатній температурі. Осад промивався 70% етанолом. Осад висушували при +37°C та розчиняли у дистильованій воді.

2.11.5. Очищення ДНК на колонках з фільтрами із скловолокна. Для очищення ДНК, а також для її виділення за агарозного гелю застосовували метод з використанням хаотропної солі та колонок з скловолоконними фільтрами. До фрагменту гелю або розчину ДНК додавали потрібний об'єм адсорбційного буфера. Далі проводили інкубування в водяній бані $+50^{\circ}\text{C}$ протягом 10 хвилин або до повного розчинення фрагменту геля. Далі на колонку навантажену 7 шарами фільтра GF/C (Whatmann) вносили по 350 мкл отриманої суміші. Колонки центрифугували у прийомних пробірках при 1000g протягом 5 хвилин. Рідину, що пройшла крізь фільтр видаляли. Далі відбувалась промивка колонки 350 мкл розчину для промивання шляхом його внесення та наступного центрифугування при 8000g тривалістю 5 хвилин. Для елюції ДНК в колонки з фільтрами вносили 20 мкл дистильованої води, витримували при кімнатній температурі протягом 1 хвилини та центрифугували при 2000g 2 хвилини.

2.11.5. Рестрикція ДНК. Загальний протокол розрізання ДНК за допомогою ендонуклеаз рестрикції базувався на рекомендаціях виробників ферментів. Для реакції брали 1 мкг ДНК та по 1,5 одиниці кожної обраної ендонуклеази. Ця суміш замішувалась у буфері від виробника ферментів, з урахуванням найбільш оптимального для даних ферментів. Сама реакція проводилась протягом 1 години при $+37^{\circ}\text{C}$ ($+25^{\circ}\text{C}$ для SmaI). Інактивували ферменти шляхом інкубації реакційної суміші при $+65^{\circ}\text{C}$ або $+80^{\circ}\text{C}$ в залежності від того, яка рестриктаза використовувалась, і що рекомендував її виробник. Аналіз результатів рестрикції проводили за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.

2.11.6. Лігування фрагментів ДНК. З'єднання шляхом лігування плазмідного вектора з цільовою послідовністю-вставкою проводили відповідно до рекомендацій виробника ензиму.

В буфері для T4 ДНК лігази готувалась суміш, яка включала 5 одиниць T4 ДНК лігази, додатково додавалась АТФ до концентрації 0,5 мМ, ДНК-вектор та ДНК-вставка вносились в молярному співвідношенні 1:3, щоб сумарна їх кількість становила 200 нг. Реакцію проводили протягом 18 годин при $+16^{\circ}\text{C}$.

Інактивація реакції здійснювалась прогріванням до $+75^{\circ}\text{C}$ протягом 20 хвилин. Інактивовану лігазну суміш використовували для трансформації компетентних клітин *E. coli*.

2.11.7. Незалежне від послідовності та лігування клонування. При створенні генетичної конструкції рЕТ28-С2 з послідовністю, яка кодує домен С2 білка BCR, застосовували метод незалежного від послідовності та лігування клонування (SLIC, sequence- and ligation-independent cloning) (172). Схема клонування представлена на рис. 2.1. ДНК-вставка отримували за допомогою двох раундного ПЛР. Другий раунд проводився з праймерами, які містять з 5'-кінця ділянки, комплементарні до ділянки плазмідного вектора в місці запланованого вбудовування довжиною 20 нуклеотидів, інша частина послідовності праймерів була комплементарна до послідовності, що кодує С2. Вектор рЕТ28 попередньо лінеаризували рестрикцією за допомогою *Vam*HI та *Xho*I ендонуклеаз. Підготовлені таким чином вектор та вставку використовували в реакційній суміші, де на 20 мкл загального об'єму були внесені: 50 нг ДНК-

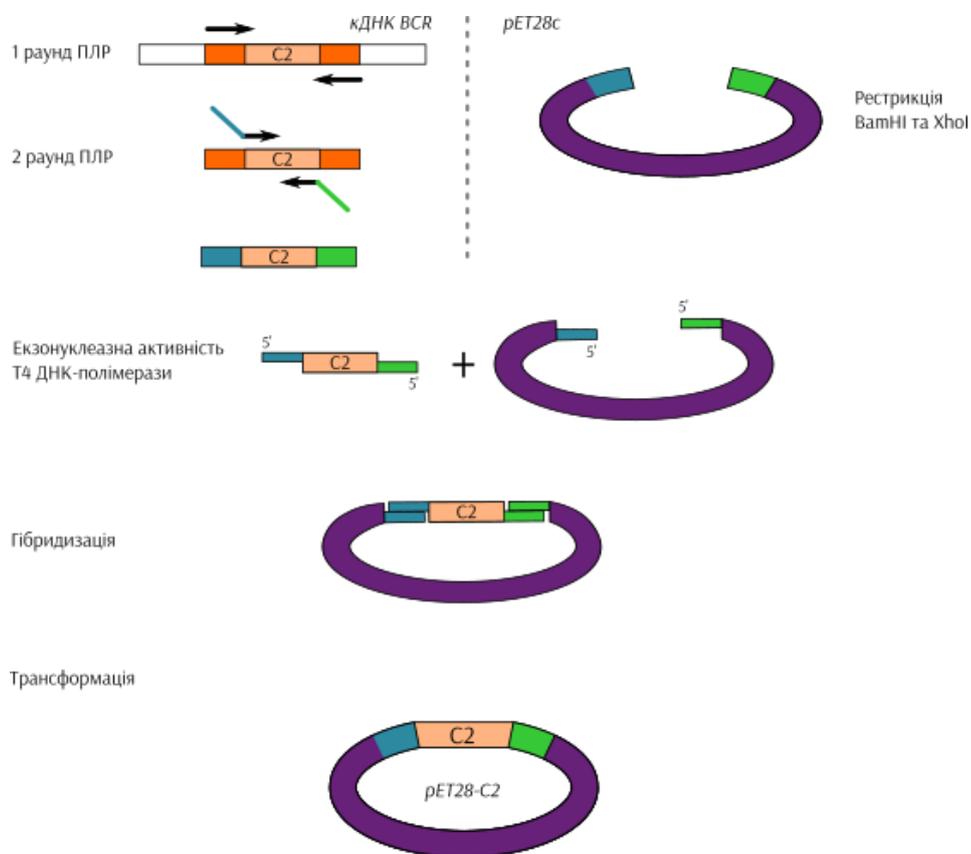


Рис. 2.1. Схема створення рЕТ28-С2

вставки, з послідовністю, що кодує C2; 50 нг лінеаризованого вектора pET28; 0,5 одиниці T4 ДНК-полімерази (ThermoScientific, США); 2мкл буфера для T4 ДНК-полімерази (ThermoScientific, США). Ця суміш інкубувалась при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. За відсутність нуклеотидів в суміші T4 ДНК-полімераза проявляла лише 3'-екзонуклеазну активність, завдяки чому на даному етапі формувались довгі (20-30 нуклеотидів) одноланцюгові кінці як на вставці, так і на векторі. Після інкубації в суміш вносили 2 мкл одного з чотирьох нуклеотидів в концентрації 10мМ для блокування екзонуклеазної активності. Реакційна суміш інкубувалась 30 хвилин при +37°C для того, щоб фрагменти згібридизувались між собою. 10 мкл суміші використовували для трансформації компетентних *E. coli*.

2.11.8. Фосфорилювання фрагментів ДНК. До ДНК вносили 1 мкл 10мМ АТФ та 0,2 мкл T4 полінуклеотид кінази (Promega, США), ретельно перемішували та інкубували протягом 30 хвилин за температури +37°C. Інактивацію ферменту проводили на водяній бані протягом 20 хвилин при +75°C.

2.11.9. Дефосфорилювання фрагментів ДНК. До реакційної суміші, яка була отримана після реакції рестрикції плазмідних векторів, вносили 1 мкл FastAP (ThermoFisher Scientific, США) та інкубували протягом 30 хвилин при +37°C. Інактивацію проводили на водяній бані протягом 20 хвилин за температури +75°C.

2.11.11. Golden Gate збірка. Спочатку проводили гібридизацію олігонуклеотидів. Формували реакційну суміш на 10 мкл, де були 1 мкл кожного з пари олігонуклеотидів, 1 мкл 10X буфер T4 ДНК-лігази, 0,5 мкл T4 полінуклеотидкінази та 6,5 мкл дистильованої води. Проводили інкубацію 30 хвилин за температури 37°C, одразу після цього в температурі 95°C протягом 5 хвилин, потім знижували температуру до 25°C та поступово по 10°C кожні 5 хвилин.

Для проведення Golden Gate збірки отриманий розчин олігонуклеотидів розводили у 10 разів. Наступним етапом було Для реакції замішували на 20 мкл суміші наступні компоненти: 2X буфер для швидкого лігування (7,5 мкл) ,

розчин 20 мкг/мкл бичачого сироваткового альбуміну (0,15 мкл), BbsI (0,2 мкл, 2 одиниці), T4 ДНК-лігаза (0,5 мкл, 2,5 одиниці), розведені гібридизовані олігонуклеотиди (1 мкл), відповідний вектор концентрацією не менше 25 мкг/мкл (1 мкл) та дистильованою водою доводили до кінцевого об'єму 20 мкл. Після чого суміш витримували за температури 37°C протягом 2 годин, після чого знижували температуру до 18°C та витримували в цій температурі впродовж 30 хвилин. Для зупинки реакції суміш переміщували в температуру 80°C на 10 хвилин. Після завершення реакційну суміш було трансформовано в компетенті клітини *E. coli*.

2.12. Бактеріальна експресія

Для отримання кожного з рекомбінантних білків, які необхідні були для досліджень міжмолекулярних взаємодій, окремо підбирались оптимальні умови для експресії. Важливим критерієм відбору умов було отримання достатньої для проведення наступних досліджень кількості білків у конформації наближеній до їх нативної. В підсумку для різних генетичних конструкцій умови відрізнялись по таким параметрам: штам *E. coli*, об'єм та склад поживного середовища, температура та час інкубування, метод індукції експресії.

Генетичну конструкцію pET28-C2 з послідовністю, яка кодує домен C2, трансформували у в хімічно компетентний штам *E. coli* ArcticExpress (DE3) (Agilent Technologies, США). Для індукції експресії використовували стратегію автоіндукції (74). Початкова культура вирощували в 4 мл середовища для росту ZYM-505 (74) протягом 18 годин при +30°C, інокулювали в 200 мл середовища для автоіндукції ZYM-5052 (74) та інкубували при +10°C при постійному перемішуванні зі швидкістю 220–250 об/хв, протягом 24 годин.

Для генетичної конструкції pGEX-4T-FNBP1 використовували також автоіндукцію. Але бактеріями для експресії були Rosetta(DE3)pLysS, тому культивування було при +37°C, а після досягнення оптичної щільності культури

OD₆₀₀=0,5 температуру знижували до +20°C. Кінцевий об'єм культури був 100 мл, час інкубації 18 годин.

Для pET32a-PH, pGEX-4T-FNBP1-N, pET42-HSPB1 використовували штам Rosetta(DE3)pLysS. Вирощували в поживному середовищі LB (1% NaCl; 1% бактотриптон; 0,5% дріжджовий екстракт) при +37°C. Об'єм кінцевої культури був 100 мл. Коли культура досягала оптичної щільності OD₆₀₀=0,5, проводили індукцію експресії 1 mM IPTG та культивували ще 4 години.

2.13. Методи роботи з білками

2.13.1 Виділення та очищення білків з полігістидиновою міткою. Цей метод застосовували для очищення рекомбінантних білків, отриманих внаслідок бактеріальної експресії генетичних конструкцій pET28-C2 та pET32-PH. Ці рекомбінантні білки містили в якості мітки полігістидин. В основі очищення таких білків лежить афінна хроматографія, яка використовує зв'язування гістидинових залишків з Ni²⁺.

Ці білки очищали в нативних умовах. Культури після індукції збирали центрифугуванням. Осади клітин суспендували в буфері для лізису (50мМ NaH₂PO₄, 300мМ NaCl, 10мМ імідазол, рН 8,0, 1мМ PMSF, 100 мкг/мл лізоциму) та інкубували на льоду протягом 30 хвилин з подальшим ультразвуковим руйнуванням (цикл з 10 секунд обробки ультразвуком з подальшим 10 секундним періодом паузи, що повторюється 6 разів). Лізовані клітини центрифугували при 16000g протягом 20 хвилин при +4°C. Очищений лізат завантажували на колонку, наповнену HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Millipore, США) або Ni-NTA агарозою (Qiagen, Німеччина), і пропускали шляхом вільного проходження за рахунок сили тяжіння. Колонку промивали буфером для промивання (50мМ NaH₂PO₄, 300мМ NaCl, 20мМ імідазол, рН 8,0) в об'ємі, що дорівнював 10 об'ємам колонки. Після цього проводили елюцію за допомогою буфера для елюції (50мМ NaH₂PO₄, 300мМ NaCl, 250мМ імідазол, рН 8,0) в об'ємі, що дорівнював 3 об'ємам колонки. Аналіз ефективності очищення проводили за допомогою електрофорезу

в поліакриламідному гелі. Очищені білки використовували для подальших досліджень

2.13.2. Виділення та очищення білків зв'язаних з глутатіон-S-трансферазою. Цей метод застосовували для очищення рекомбінантних білків, отриманих внаслідок бактеріальної експресії генетичних конструкцій pGEX-4T-FNBP1, pGEX-4T-FNBP1-N та pET42-HSPB1. Ці рекомбінантні білки містили в якості мітки глутатіон-S-трансферазу (glutathione S-transferase, GST). В основі очищення таких білків лежить афінна хроматографія, яка використовує зв'язування глутатіон-S-трансферази з глутатіоном.

Культуру бактеріальних клітин після індукції збирали центрифугуванням. Ресуспендували осад клітин в охолодженому до +4°C PBS, що містив 1мМ PMSF та 100 мкг/мл лізоциму, в об'ємі рівному 1/25 від об'єму взятої культури клітин. Суспензію витирмували на льоду 30 хвилин. Лізат піддавали ультразвуковій дезінтеграції протягом 6 циклів (10-секундний імпульс після якого 10-секундний період паузи, всі цикли проводили на льоду). Лізат центрифугували при 16000g протягом 20 хвилин за +4°C. Супернатант відбирали для афінної хроматографії.

Врівноважена глутатіон-сефароза 4В (SigmaAldrich, США) готувалась у тому ж буфері, який використовувався для лізису. Об'ємна частка самої глутатіон-сефарози 4В становила 50%. Цю суспензію додавали з розрахунку 20 мкл суспензії до кожних 2 мл розчинної фракції лізату. Отриману суміш інкубували 4 год при +4°C з постійним перемішуванням. Після цього суспензію осаджували протягом 3 хв при 1000g за +4°C. Супернатант видалявся, а осад (~100 мкл) промивали від незв'язаних білків тричі шляхом додавання 100 мкл PBS, перемішування протягом 10 хвилин та осадження протягом 3 хв при 500g за +4°C. Отримана суспензія використовувалась або для елюції цільового білка, або для GST-пулдауну. Для елюції до осаду додавали 100 мкл PBS та доводили до 300 мкл буфером для елюції (50мМ Tris, 10мМ глутатіон, рН 8,0). Осаджували при 4000g при +4°C протягом 1 хвилини. Переносили розчин у лід. Відбирали супернатант, залишаючи осад. Ресуспендували осад в 100 мкл буфера для елюції з глутатіоном. Інкубували з перемішуванням при +4°C протягом 1 години. Потім

центрифугували при 500g протягом 5 хвилин. Відбирали верхню фракцію з очищеним білком. Аналіз ефективності очищення проводили за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі. Очищені білки використовували для подальших досліджень.

2.13.3. Електрофоретичне розділення білків у поліакриламідному гелі.

Електрофоретичне розділення білків у денатуруючих умовах в присутності додецилсульфату натрію проводили на основі методу Лемлі (173). Поліакриламідний гель, в якому проводився електрофорез білків, є результатом полімеризації акриламідну та бісакриламідну в співвідношенні 29:1. Він складався з двох частин: 5% гель для концентрування (pH 6,8) та гель для розділення (pH 8,8), який міг бути різної концентрації в межах 8-12% для кращого розділення білків різних розмірів. Схеми приготування представлено в таблиці 2.2.

Перед внесенням до зразків додавали буфер для нанесення з β -меркаптоетанолом (200 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 400мМ β -меркаптоетанол, 4% SDS, 0,01% бромфеноловий синій, 40% гліцерин). Після цього зразки поміщали у киплячу баню на 5 хвилин. Ця процедура робилась для забезпечення денатурації білків. Для оцінки розміру досліджуваних білків в одну із лунок вносили маркер молекулярних мас PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoFischer Scientific, США).

Електрофорез проводили у Tris-гліциновому буфері (25мМ Tris, pH 8,3, 192мМ гліцин, 0,1% SDS) під напругою 120В під час проходження зразків через гель для концентрування та 150-170В коли зразки були гелі для розділення.

Після закінчення електрофорезу білки візуалізували шляхом фарбування та фіксації гелю в розчині Кумасі R-250 (0.125% спиртового розчину Кумасі R-250, 5% оцтова кислота). Після фарбування гелі відмивали в розчині 40% етанолу і 3% оцтової кислоти.

Також гелелектрофорез в поліакриламідному гелі проведений за даною методикою міг бути початковим етапом перед Вестерн-блот аналізом.

Таблиця 2.2.

Склад поліакриламідних гелів для концентрування та розділення

Компоненти	Кількість в мл			
	5%	8%	10%	12%
Дистильована вода	1,4	4,6	4,0	3,3
30% розчин суміші акриламіду:бісакрилміду (29:1)	0,33	2,7	3,3	4,0
1М Tris, рН 6,8 (для концентрування) або 1М Tris, рН 8,8 (для розділення)	0,25	2,5	2,5	2,5
10% розчин SDS	0,02	0,1	0,1	0,1
10% розчин персульфату амонію	0,02	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,002	0,006	0,004	0,004

2.13.4. Вестерн-блот аналіз. Після електрофоретичного розділення білків у поліакриламідному гелі здійснювали їх перенесення на нітроцелюлозну мембрану. Це відбувалось у буфері для переносу (192мМ гліцин, 25мМ Tris-HCl, 20% метанол) в апараті для електропереносу (BioRad, США) при 250 мА протягом 1,5 години.

Після елетроперенесення мембрана з білками блокувалась розчином бичачого сироваткового альбуміну (БСА) протягом 18 годин при +4°C. Потім блокована нітроцелюлозна мембрана інкубувалась протягом 1 год з розведеними первинними антитілами. Розведення проводили в TBST (50мМ Tris рН7,5, 150мМ NaCl, 0,05% Tween 20) відповідно до рекомендацій виробника антитіл. Після інкубації з антитілами проводили відмивання від них у TBST тричі протягом 5 хвилин. Наступною була інкубація протягом 1 години з вторинними антитілами, які кон'юговані з пероксидазою хрому. Мембрану відмивали від вторинних антитіл за тою ж схемою, що і після первинних.

Наступним етапом було візуалізація результатів за допомогою хемілюмінісценції. Для цього готували свіжий буфер ECL за допомогою змішування у співвідношенні 1:1 буферу А (100мМ Tris-HCl, рН8,5, 2,5мМ люмінол, 0,4мМ кумарова кислота) та буферу Б (100мМ Tris-HCl, рН8,5, 0,03% H₂O₂). Виготовлений буфер ECL наносили на мембрану з білками та одразу

здійснювали реєстрацію сигналу хемілюмінісценції на приладі Molecular Imager ChemiDoc XRS+ (BioRad, США). Зображення з результатами аналізували за допомогою програми ImageLab.

2.13.5. GST-пулдаун. Метод полягає у перевірці взаємодії між білком, який містить GST мітку та іммобілізований на глутатіон-сефарозі 4В, та іншим очищеним протеїном без GST мітки. В якості негативного контролю зв'язування паралельно перевіряється зв'язування з GST міткою, яку отримують шляхом експресії порожнього вектора.

До суспензії глутатіон-сефарози 4В, що містить білок інтересу, та до глутатіон-сефарози 4В з одним GST-фрагментом додавали рівні кількості очищеного іншого білка, зв'язування з яким досліджувалось. Суспензії інкубували за температури $+4^{\circ}\text{C}$ протягом ночі (18 годин) з постійним перемішуванням. Після інкубації суспензію центрифугували при 500g протягом 1 хвилини при $+4^{\circ}\text{C}$, супернатант відбирали для аналізу. Осад тричі промивали в PBS, щоб усунути білки, що неспецифічно зв'язались.

Після цього проводили елюцію білків, які залишились на глутатіон-сефарозі 4В, шляхом додавання буферу для елюції з глутатіоном, що так само як при очищенні мічених GST білків. Інкубували з постійним перемішуванням протягом 3 годин при $+4^{\circ}\text{C}$. Після цього суспензію осаджували центрифугуванням при 13000g протягом 10 хвилин при $+4^{\circ}\text{C}$. Отриманий супернатант, що містив вивільнені білки, відбирали для наступного аналізу (174).

Результати пулдауну досліджували за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі, а також проводили вестерн-блот для ідентифікації білків.

2.14. Круговий дихроїзм

Очищений рекомбінантний білок діалізували проти буфера для експерименту з круговим дихроїзмом (10мМ KH_2PO_4 , 50мМ Na_2SO_4 , pH 7,48). Концентрація білка становила 0,484 мг/мл (або 17,73 мікромоль/л).

Використовували спектрополяриметр J-810 (JASCO) з кварцовою кюветою діаметром 1 см. Сімдесят одна точка даних була зареєстрована при $+37^{\circ}\text{C}$ 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. Ці дані були використані для аналізу на сервері BeStSel (175–179).

2.15. Аналіз зв'язування з фосфоліпідами

Для ідентифікації ліпідів, які можуть взаємодіяти з C2 доменом BCR, використовували мембранну смужку з нанесеними ліпідами PIP Strip P-6001, (Echelon Biosciences). Ця мембранна смужка містила різні ліпіди: лізофосфатидна кислота (LPA), лізофосфохолін (LPC), фосфатидилінозитол (PI), фосфатидилінозитол 3-фосфат (PI(3)P), фосфатидилінозитол 4-фосфат (PI(4)P), фосфатидилінозитол 5-фосфат (PI(5)P), фосфатидилетаноламін (PE), фосфатидилхолін (PC), сфінгозин 1-фосфат (S1P), 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), фосфатидна кислота (PA), фосфатидилсерин (PS). Експеримент проводився згідно з протоколом виробника. Першим кроком було блокування в PBS-T (0,1% (об./об.) Tween 20) з 3% бичачим сироватковим альбуміном протягом 1 години при кімнатній температурі з легким перемішуванням. Потім смужку інкубували з 0,5 мкг /мл очищеного домену C2 у тому ж буфері протягом 1 години при кімнатній температурі з обережним перемішуванням. Після триразового промивання PBS-T смужку інкубували з розведенням 1:400 анти- полігістидинових антитіл (Sigma Aldrich, MAB3844) у PBS-T протягом 1 години при кімнатній температурі. Потім стадію промивання повторювали тричі. Інкубацію з вторинними кон'югованими з пероксидазою хрому козячими антимишачими вторинними антитілами (Abclonal) , розведеними 1:5000 у буфері PBS-T, додавали до мембрани та інкубували 1 годину при

температурі навколишнього середовища на платформі для перемішування. За цим слідувала стадія промивання в умовах, описаних вище. Мембранну смужку інкубували протягом 1 хвилини з 1 мл буфера з підвищеною хемілюмінесценцією (ECL) (100мМ Tris рН 8,8, 2,5мМ люмінол, 0,4мМ кумарова кислота та 0,02% H_2O_2) і сигнал хемілюмінесценції детектували за допомогою системи Chemidoc (BioRad, США).

2.16. Культивування еукаріотичних клітин

Клітини 293Т та J774 вирощували в середовищі DMEM (ThermoFisher Scientific, США), з додаванням 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби (FBS), пеніциліну (50 од/мл) та стрептоміцину (100 мкг/мл). Для вирощування клітин K562 використовували середовище RPMI 1640 (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби (Sigma, США) пеніциліну (50 од/мл) та стрептоміцину (100 мкг/мл). Всі клітинні лінії культивували в атмосфері 5% CO_2 зі зволоженням при температурі $+37^{\circ}C$. При досягненні клітинами 70% конфлюентності їх пересівали у розведенні 1 до 10.

У випадку суспензійної культури K562 клітини центрифугували при 1000 обертів/хвилину протягом 2 хвилин. Після видалення надосаду осаджені клітини ресуспендували свіжим середовищем RPMI 1640 та переносили в новий стерильний посуд.

Оскільки клітини 293Т та J774 є адгезивними та прикріплюються до дна посуду, то їх пересівання вимагало етапу відкріплення від поверхні. Для цього спочатку клітини промивались PBS заздалегідь прогрітим на $+37^{\circ}C$. Власне відкріплення полягало у інкубації клітин з Trypsin-EDTA протягом 2 хвилин при $+37^{\circ}C$. Після клітин обережно змивались свіжим середовищем DMEM з сироваткою та переносились в новий посуд.

2.17. Трансфекція еукаріотичних клітин

В експерименті з котрансфекцією рJ3H-FNBP1 з рEGFP-PH клітин 293T використовували реагент TurboFect Transfection Reagent (ThermoFisher Scientific, США). Відповідно до протоколу виробника, для одної лунки 6-лункового планшета, де площа лунки складала 9,5 см², брали 2 мкг сумарної ДНК розчиняли в 400 мкл в середовищі DMEM без сироватки. Після струшування реагент для трансфекції додавали в об'ємі 6 мкл до розчину з ДНК. Суміш одразу інтенсивно перемішувалась, а потім витримувалась при кімнатній температурі протягом 20 хвилин. Після цього суміш для трансфекції рівномірно розподілялась по дну лунки. Після цього зверху на розподілену суміш висівали клітини. Далі проводили типове інкубування клітин при +37°C в атмосфері 5% CO₂ зі зволоженням. Ефективність трансфекції оцінювали після 24-48 годин вирощування.

2.18. Приготування лізатів еукаріотичних клітин

Еукаріотичні клітини промивали PBS та додавали лізис буфер NP40 (150мМ NaCl, 1,0% Triton X100, 50мМ Tris-HCl pH 8,0, 1мМ PMSF, 2мМ NaVO₃) та витримували протягом 20 хвилин на льоду. Після цього клітини центрифугували 15 хвилин при 12000 обертів/хвилину за температури +4°C. Надосад відбирали у чисту охолоджену мікропробірку. Отриманий лізат використовували для наступних досліджень.

2.19. Коїмунопреципітація

Коїмунопроцепітацію проводили з лізатом клітин 293T, які були попередньо трансфіковані рJ3H-FNBP1 з рEGFP-PH, або рJ3H з рEGFP-PH. Використовували сефарозу G (Sigma-Aldrich, США), яку заздалегідь врівноважували лізис буфером NP40 (150мМ NaCl, 1,0% Triton X100, 50мМ Tris-HCl pH 8,0, 1мМ PMSF, 2мМ NaVO₃). Після цього її інкубували протягом 3 годин з 2-3 мкл з антитілами anti-НА (Sigma-Aldrich, США) при постійному

перемішуванні при +4°C. Після цього додавали лізати клітин та інкубували знову протягом 3 годин при постійному перемішуванні при +4°C. Після цього суспензію центрифугували протягом 2 хвилин при 3000 обертів/хвилину при +4°C та промивали буфером NP40 з повторним центрифугуванням. До зразків додавали буфер для нанесення, готували для електрофорезу в поліакриламідному гелі з наступним вестерн-блот аналізом.

2.20. Конфокальна мікроскопія

Клітини відбирали шляхом центрифугування 2 хвилини при 2000g. Надосад видаляли, а клітини промивали буфером PBS (140мМ NaCl, 2,7мМ KCl, 10мМ Na₂HPO₄, 1.8 мМ KH₂PO₄) та фіксували за допомогою 4% розчину формальдегіду з 0,2% Triton X-100 в буфері при кімнатній температурі протягом 20 хвилин. Після чого три рази відмивали PBS шляхом додавання та центрифугування протягом 2 хвилин при 2000g та протягом 1 години блокували клітини за допомогою розчину бичачого сироваткового альбуміну. Після цього клітини протягом 1 години почергово інкубували з відповідними первинними та вторинними антитілами у визначеному виробником розведенні та промивали три рази буфером PBS шляхом центрифугування 2 хвилини при 2000g. Ядра клітин фарбували за допомогою DAPI (ThermoFisher Scientific, США) протягом 2 хвилин. 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.

2.21. Біоінформатичні інструменти використані в роботі

Аналіз білків. За відсутності публічно доступних експериментальних даних щодо структури білків та їх окремих доменів виникала необхідність у її передбаченні на основі відомої амінокислотної послідовності. Вторинну структуру білків передбачали за допомогою Psipred 4.0 та S4pred. Для третинної структури використовували DMPfold 2.0. Властивості зв'язування з металами оцінювались за допомогою DMPmetal. Усі ці інструменти доступні на PSIPRED Workbench (<https://bioinf.cs.ucl.ac.uk>) (180–183). Третинні структури візуалізувались та аналізувались за допомогою веб-застосунку 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/>)(175–179).

Аналіз сайтів фосфорилування. Для аналізу сайтів фосфорилування білків застосовували бази PhosphoSitePlus (184,185), Phospho.ELM (186,187), а також Group-based Prediction System (GPS) 6.0, що є ресурсом для передбачення сайтів фосфорилування для окремих кіназ (188,189). Аналіз здійснювався на основі амінокислотних послідовностей білків, що були наявні в базі UniProt: FNBP1 (Q96RU3-1), SMC1A (Q14683), HSPB1 (P04792).

Аналіз даних секвенування наступного покоління. Для встановлення вихідної послідовності ділянки розриву в геномі клітин K562 брали дані геномного секвенування наступного покоління, доступні в публічній базі даних (ENCFF462TFC). Для аналізу використовували SAMtools (190), BWA (191,192), Breakdancer (193). Для візуалізації використовували Integrative Genomics Viewer (IGV) версії 2.19.4 (194–196).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Вивчення структурно-функціональних особливостей C2 домену

Для вивчення C2 домену білка BCR проводили моделювання вторинної та третинної структури, щоб попередньо оцінити його структурні особливості. Далі створювалась генетична конструкція для бактеріальної експресії, на основі якої отримувався рекомбінантний білок, що відповідав C2 домену білка BCR. Структуру отриманого білка валідували методом кругового дихроїзму. Для C2 доменів інших білків відомо їх специфічне зв'язування з фосфоліпідами, що дозволяє рекрутувати білки, що їх містять, до конкретних мембранних структур клітини. В даній роботі досліджували чи взаємодіє отриманий рекомбінантний C2 домен з фосфоліпідами.

3.1.1. Моделювання вторинної та третинної структури C2 домену білка BCR. Оскільки вторинна та третинна структура цього домена не є визначеною, то нами було проведено їх передбачення за допомогою ряду біоінформатичних інструментів (Pisipred 4.0, S4pred, DMPfold 2.0). Ці передбачення робились на основі амінокислотної послідовності білка BCR. Отримані результати були додатково співставлені із передбаченням третинної структури від AlphaFold.

Візуальне резюме результатів прогнозу вторинної структури, представлене на рисунку 3.1. На поліпептидній послідовності BCR межі C2 домена 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..

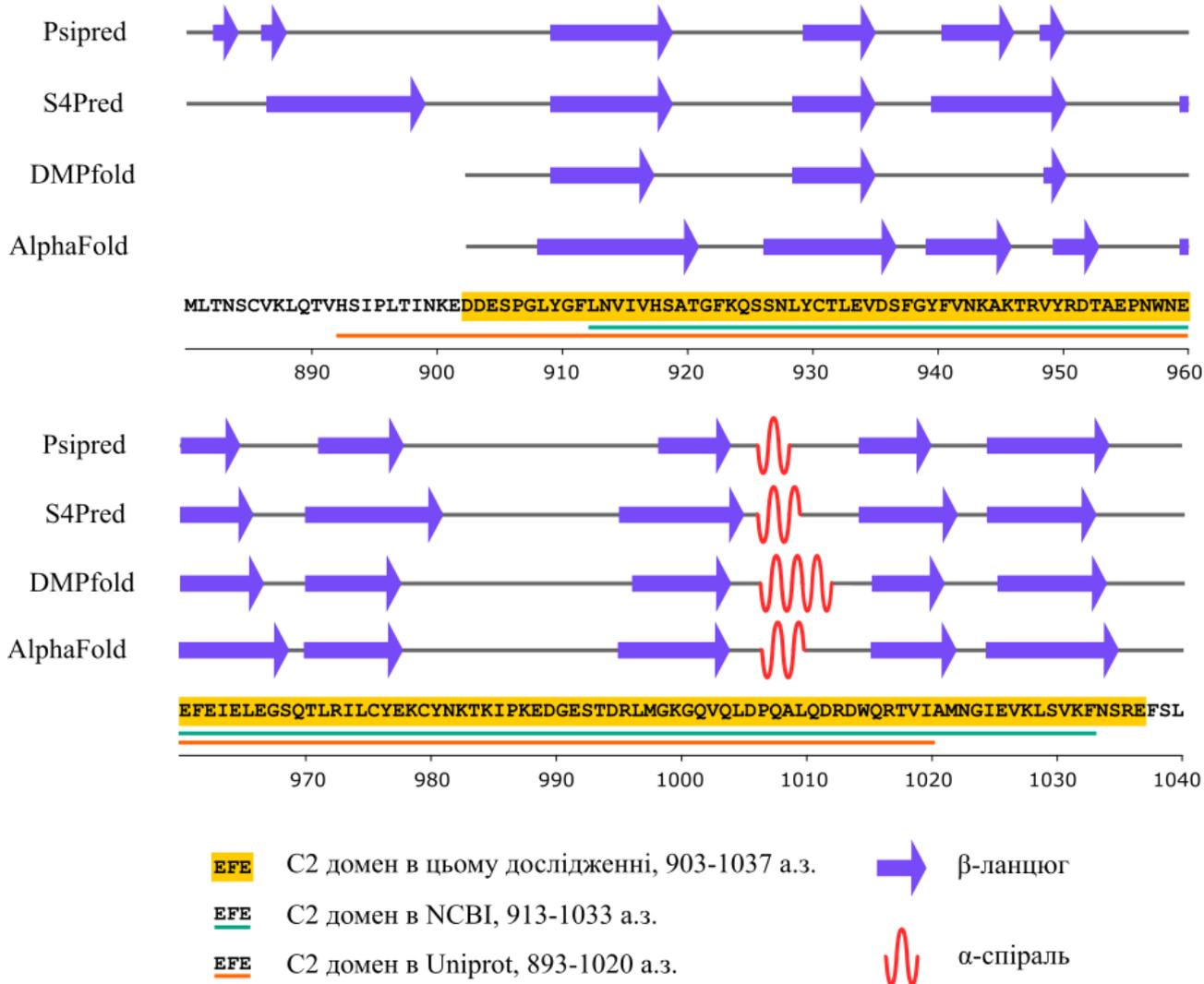


Рис. 3.1. Передбачення вторинної структури C2 домена білка BCR

Тому одним з завдань було визначитись з тим, яку версію C2 домена взяти за основу для створення рекомбінантного C2. Очевидно, що раціональним підґрунтям для цього була відповідність передбачених структур цих версій характерним структурам відомих C2 доменів. Інструменти Psipred і S4pred показали, що амінокислотна послідовність, заснована на версії анотації NCBI, з більшою ймовірністю дає структуру типову для доменів C2. Вісім надійних бета-ланцюгів, довжина яких перевищує три амінокислоти, було передбачено для цього варіанту домена C2. Натомість для UniProt версії C2 число передбачених бета-ланцюгів було менше восьми (у передбаченні S4pred), а довжина деяких цих ланцюгів становила три і менше амінокислот (у передбаченнях Psipred і S4pred). Версія NCBI домену C2 була взята як основа, але була розширена з позиції 913

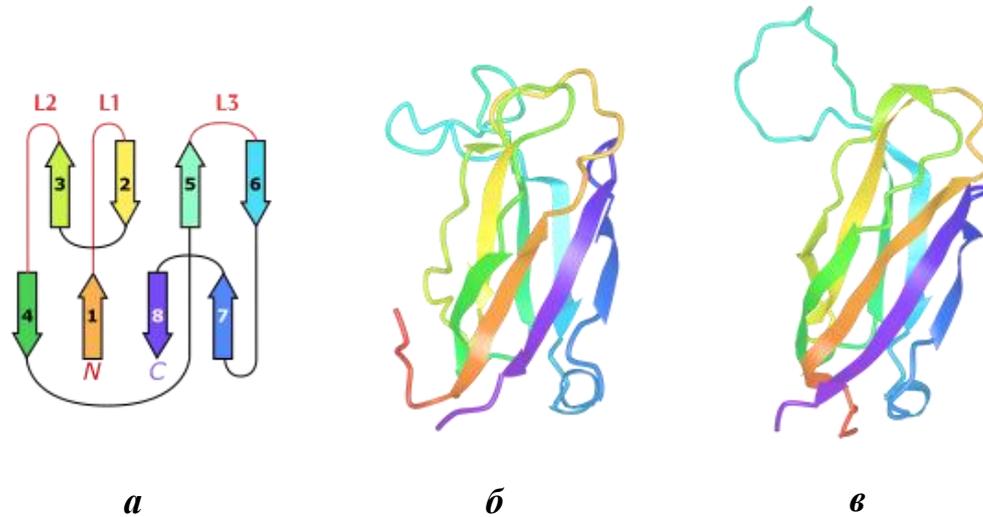


Рис 3.2. Передбачення третинної структури C2 домена BCR білка.
a – схематичне відображення топології C2 доменів II типу, ***б*** – структура передбачена за допомогою DMPfold, ***в*** – структура передбачена AlphaFold

до позиції 903. Це зроблено для того, щоб отримати потенційно довший перший бета-ланцюг, який був би розрізаний без цієї корекції. Остаточна послідовність, яку ми обрали для вивчення домена C2 білка BCR, була 903-1037 а.з.

Для цієї остаточної версії послідовності C2 було повторено передбачення як вторинної, так і третинної структури. Для передбачення третинної структури використовували DMPfold 2.0 (181). 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>) (178,179). Загалом ці дві методики показали структуру, близьку до типових доменів C2 (рис. 3.1 та рис. 3.2). Для доменів C2 інших білків було описано два типи можливих топологій на основі їх різниці в перестановці бета-ланцюгів (68,197,198). Згідно з передбаченнями третинної структури, C2 домен BCR може належати до II типу топології (рис. 3.2.). Експериментальне підтвердження третинної структури C2 домена BCR потребує подальших досліджень.

Послідовність білка BCR з 903-1037 а.з. була обрана як та, що відповідає С2 домену. Тому на наступних етапах роботи над отриманням ізольованого С2 домена в рекомбінантній формі саме вона була взята за основу.

3.1.2. Створення генетичної конструкції рЕТ28-С2. В якості базового вектора для бактеріальної експресії було обрано рЕТ-28с-sumo. Він був лінеаризований рестрикцією ендонуклеазами рестрикції BamHI та XhoI (ThermoFisher Scientific, США) згідно з протоколом виробника. Рестрикційні фрагменти розділяли за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. З гелю вирізали та виділяли фрагмент, що відповідав за розміром очікуваному 5533 п.н.

Вставку, що містила послідовність, яка кодує С2 домен, створювали наступним чином. Проводили два раунди ПЛР. Перший раунд проводили з зовнішніми праймерами (С2Е-F 5'-CGCAACGGCAAGAGTTACAC-3' та С2Е-R 5'-GATGTAGGGCASCCTTGG-3'), які дозволяли ампліфікувати дещо ширшу ділянку, ніж була запланована для вставляння в вектор. В якості матриці на цьому етапі використовували генетичну конструкцію, що кодує повнорозмірний р230 BCR-ABL1 була люб'язно надана N. Heisterkamp (Children's Hospital of Los Angeles, USA). Було отримано продукт ПЛР, який відповідав очікуваному розміру 696 п.н. (рис. 3.3.а).

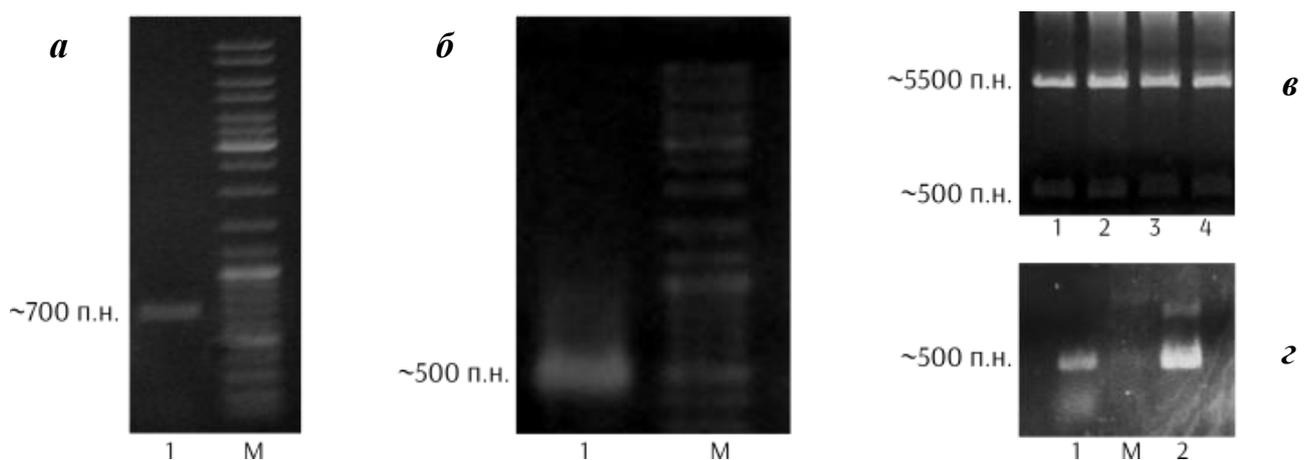


Рис 3.3. Створення рЕТ28-С2. *а* – результат 1 раунду ПЛР, *б* – результат 2 раунду ПЛР, *в* – рестрикційний аналіз векторів, що містять вставку, *г* – результат ПЛР аналізу на наявність вставки

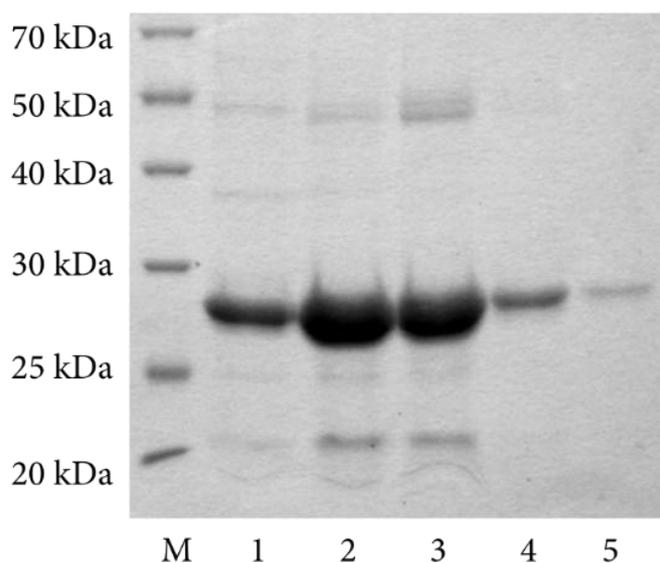


Рис 3.4. Очищений рекомбінантний C2 домен білка BCR. 1-5 – стадії елюції, М – маркер молекулярної ваги PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA).

Очікуваний білок, який представляв собою комбінацію домену C2 і частини, кодованої вектором, мав довжину 238 амінокислот і мав молекулярну масу 27292,67 (розраховано на https://web.expasy.org/compute_pi/). Концентрацію та чистоту білка визначали за допомогою лінеаризованого аналізу Бредфорда (199) та електрофорезу в поліакриламідному гелі (рис. 3.4.). Молекулярна маса виділеного білка відповідала очікуваній у ~27 кДа.

3.1.4. Результати кругового дихроїзму рекомбінантного C2 домену білка BCR. Спектри кругового дихроїзму (КД) у представленні дельта-епсилон (рис. 3.5.) аналізували на сервері BeStSel (175–179). Оцінений вміст вторинної структури показав 40,9% антипаралельних бета-ланцюгів (лівозакручених – 2,2%, релаксованих – 21,8%, правозакручених – 17%). Структури альфа-спіралі оцінені як 0%, повороти – 14,2%, інші структури – 44,9%.

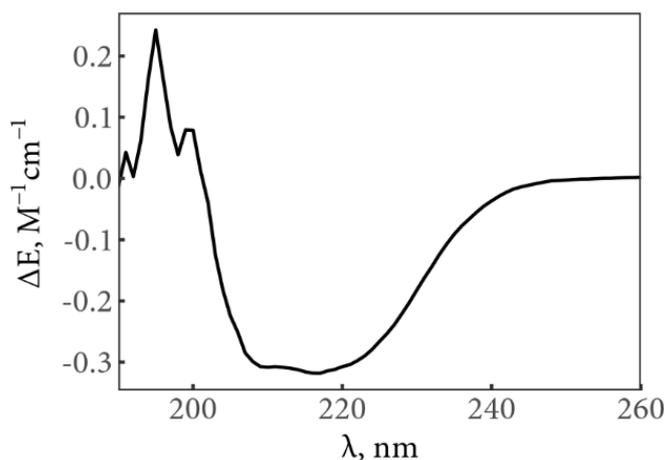


Рис 3.5. Спектр кругового дихроїзму рекомбінантного C2 домена білка BCR

На основі спектру кругового дихроїзму сервер BeStSel передбачив клас, архітектуру та топологію білка (на основі класифікації CATH, <https://www.cathdb.info/>). Результати показали, що білок належить до класу Mainly Beta (має кодування 2) з 99,4%, до архітектури Sandwich (позначається як 2.60) з 83,0% і до топології Immunoglobulin-like (кодується як 2.60.40) з 70,1%. У класифікації CATH домену C2 належать до гомологічної надродини 2.60.40.150, яка є підмножиною визначеного вище класу, архітектури та топології (200). Отже, отримані дані спектра кругового дихроїзму свідчать про те, що рекомбінантний білок мав вміст вторинної структури, подібний до того, що можна очікувати від домена C2.

3.1.5. Взаємодія рекомбінантного C2 домену білка BCR з фосфоліпідами. Завдяки інкубуванню рекомбінантного домена C2 білка BCR разом з мембраною, що містила різні фосфоліпіди, було виявлено його здатність зв'язувати деякі з них (рис. 3.6).

Серед ліпідів, які взаємодіяли з доменом C2, 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).

Різні мембранні структури клітини мають в своєму складі різні фосфоліпіди. Тому С2 домени часто за рахунок специфічності зв'язування з певними фосфоліпідами можуть приводити до прикріплення білків до конкретних місць в клітинах. І розуміння з якими саме ліпідами 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

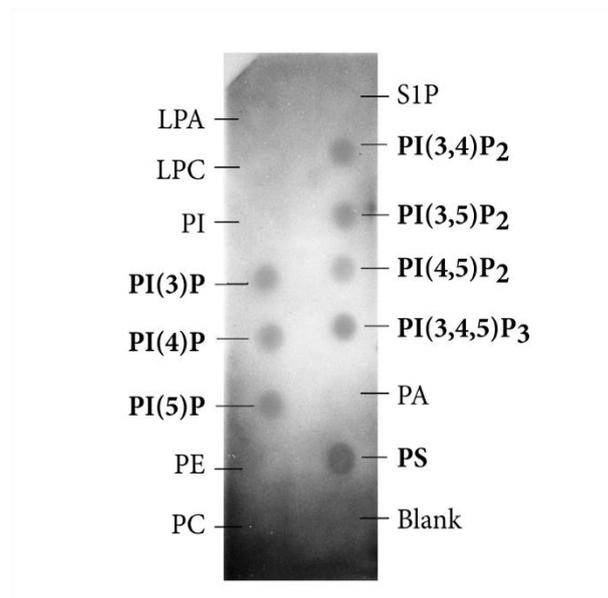


Рис 3.6. Зв'язування фосфоліпідів рекомбінантного С2 домена білка BCR. LPA - лізофосфатидна кислота, LPC - ліпофосфохолін, PI - фосфатидилінозитол, PI(3)P - фосфатидилінозитол-3-фосфат, PI(4)P - фосфатидилінозитол-4-фосфат, PI(5)P - фосфатидилінозитол-5-фосфат, PE - фосфатидилетаноламін, PC - фосфотидилхолін, 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 С2 доменом

посередником зв'язування за рахунок електростатичних взаємодій. Проте відомі і C2 домени, що є кальцій-незалежними. Проведені в цій роботі дослідження зв'язування з ліпідами не дають відповідь щодо ролі кальцію, оскільки спеціально іони Ca^{2+} не додавались у буфер, що використовувався, проте не вживали і додаткових заходів, щоб прибрати можливу контамінацію іонами Ca^{2+} .

Для добре вивчених доменів C2 зв'язування Ca^{2+} часто пов'язане з петлями між бета-ланцюгами (рис. 3.2.a, позначені L1, L2, L3). 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 (P-значення: 0,16) і негативно зарядженому Glu 978 (P-значення: 0,10). Ці залишки розташовані в передбачених петлях. Водночас у аналізуючи саму послідовність 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.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

Малюта ОВ, **Кравчук ІВ**, Тютюнникова АП, Лисецька ТЮ, Дибков МВ, Телегеев ГД. Структурно-функціональна роль доменів PH і C2 білка Bcr/Abl в розвитку Ph-позитивних лейкозів. In: Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології. Київ; 2010. р. 115–6.

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.

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.

3.2. Білок-білкова взаємодія між BCR та FNBP1

Для встановлення взаємодії білка FNBP1 з PH доменом білка BCR застосовувались різні методи. Додатково вивчали колокалізацію FNBP1 та BCR.

3.2.1. Коімунопреципітація PH домену білка BCR з повнорозмірним FNBP1 у клітинах 293Т. Клітини 293Т були трансфіковані рJ3H-FNBP1 та рEGFP-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. 3.7.). Таким чином було показано взаємодію між повнорозмірним білком FNBP1 та PH доменом білка BCR.

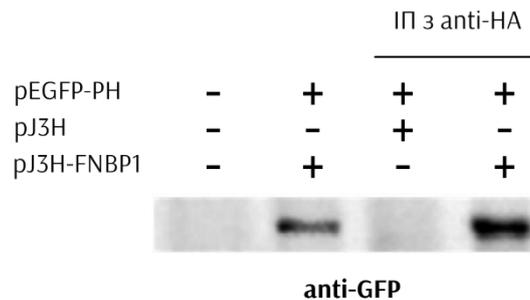


Рис. 3.7. Коімунопреципітація PH домену BCR разом з повнорозмірним FNBP1 в клітинах 293Т

3.2.2. Створення генетичної конструкції pGEX-4T-FNBP1. Генетична конструкція для бактеріальної експресії повнорозмірного FNBP1 створювалась на основі вектора pGEX-4T-1. Джерелом послідовності, яка кодує білок FNBP1, виступав вектор FBP17-pmCherryC1, що був дарунком від Christien Merrifield (Addgene #27688) (167). Цю послідовність вирізали за допомогою ендонуклеаз рестрикції BglII та EcoRI. Цей ДНК-фрагмент мав розмір 1850 п.н. Вектор pGEX4T-1 лінеаризували рестрикцією за допомогою BamHI та EcoRI. Лінеаризований вектор лігували з вирізаною послідовністю, яка кодує повнорозмірний FNBP1. Лігазна суміш використовувалась для трансформації хімічно компетентних клітин *E. coli* штаму TOP10. Аналіз та відбір клонів бактерій, що містили генетичну конструкцію з цільовою вставкою, проводився за допомогою рестрикції виділених з них плазмід. Використовували рестрикцію ендонуклеазою HindIII, внаслідок чого у випадку правильної генетичної конструкції мав утворюватись один фрагмент розміром ~6800 п.н. (рис. 3.8.). Коректна конструкція була використана для бактеріальної експресії.

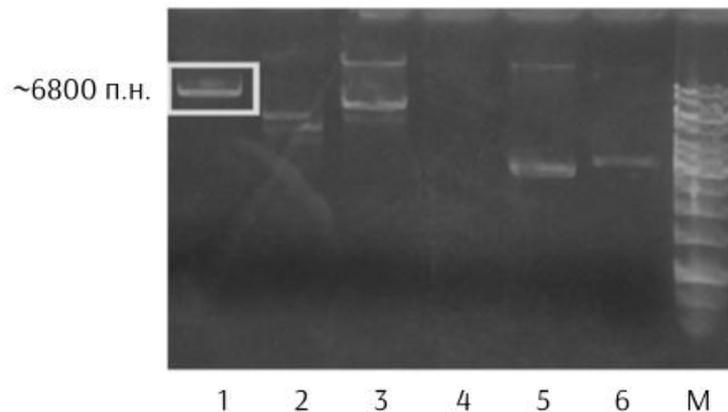


Рис 3.8. Рестрикційний аналіз результатів створення pGEX-4T-FNBP1. 1-6 – плазмідна ДНК, виділена з різних клонів, М – маркер 1 kb DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, США). Виявлена правильна конструкція в 1

3.2.3. Виявлення взаємодії повнорозмірного FNBP1 з PH доменом BCR за допомогою GST-пулдауну. Принцип методу GST-пулдаун можна описати таким чином. Для того щоб дослідити чи взаємодіють два білки між собою, один з них іммобілізується на глутатіон-сефарозу 4B за рахунок наявності GST мітки. Після чого через цю сефарозу пропускають інших досліджуваних білок, який GST мітки не має, а тому зв'язатись з сефарозою самостійно не здатен. Якщо взаємодія між білками є то другий білок також іммобілізується на сефарозі за рахунок цієї білок-білкової взаємодії. В нашому дослідженні проводили виявлення взаємодії між повнорозмірним FNBP1 та рекомбінантним PH доменом білка BCR.

Зі створеною конструкцією pGEX-4T-FNBP1 проводили бактеріальну експресію в *E. coli* штаму Rosetta(DE3)pLysS. Автоіндукція використовувалась для ініціювання синтезу рекомбінантного білка в бактеріях. Оскільки даний рекомбінантний білок містив додатково глутатіон-S-трансферазу, то для його очищення використовували глутатіон-сефарозу 4B. Очищений та зв'язаний з глутатіон-сефарозою 4B білок FNBP1 застосовували безпосередньо для пулдауну. Таким самим способом за допомогою порожнього вектора pGEX-4T-1 отримували глутатіон-сефарозу 4B, 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 pET32a-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 4B, 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. 3.9). За допомогою антитіл проти гістидину виявлено наявність PH домену у результатах пулдауну з FNBP1 та відсутність PH

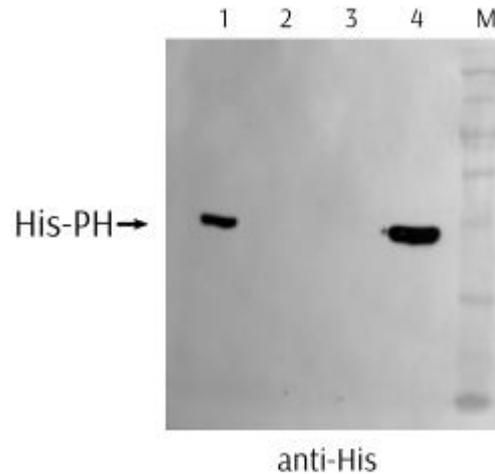


Рис. 3.9. Вестерн-блот аналіз результатів GST-пулдауну рекомбінантного PH домена BCR, міченого гістидином, з FNBP1, міченого GST. 1 – фракція елюції His-міченого PH домену BCR; 2 – загальний лізат Rosetta(DE3)pLysS, в яких була експресія рекомбінантного GST-FNBP1; 3 – результат пулдауну PH з білком GST, зв’язаним з глутатіон-сефарозою 4В (негативний контроль); 4 – результат пулдауну PH з GST-FNBP1, зв’язаним з глутатіон-сефарозою 4В; М – маркер молекулярної ваги

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.

3.2.4. Створення генетичної конструкції pGEX-4T-FNBP1-N. Для виявлення чи взаємодіє PH домен білка BCR з N-кінцевою частиною FNBP1 було необхідно створити генетичну конструкцію, яка включала в себе ділянку, що кодує відповідну ділянку білка. Були підібрані праймери N-FNBP1-F 5'-CATGAGCTGGGGCACCGAG-3' та N-FNBP1-R 5'-GTGCGCTTCATTGGCTGAGTG-3', які дозволяли отримати фрагмент нуклеотидної послідовності, яка кодувала перші 293 амінокислоти білка FNBP1. Проводили ПЛР з цими праймерами, де в якості матриці виступав вектор FBP17-pmCherryC1 (Addgene #27688) (167).

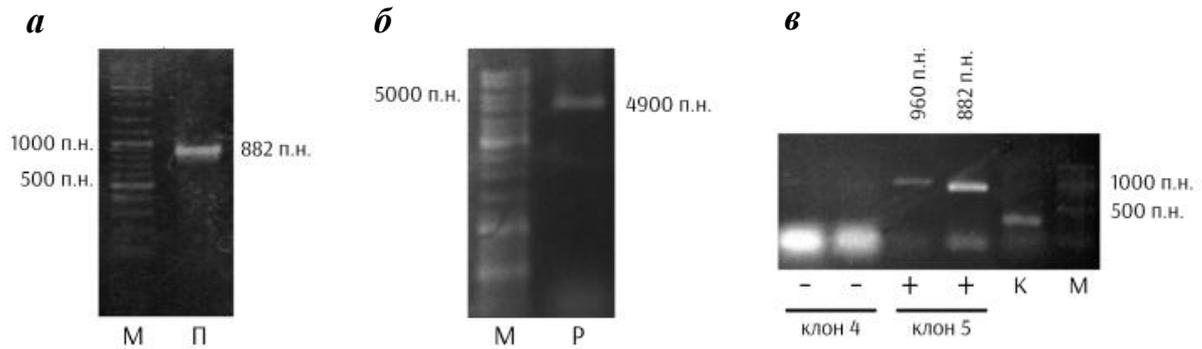


Рис 3.10. Створення rGEX-4T-FNBP1-N. *a* – ПЛР-продукт, що відповідав цільовій послідовності, що кодує N-кінець білка FNBP1, *б* – результат рестрикції rGEX-4T-1 за SmaI, *в* – ПЛР аналіз на наявність вставки у створеній генетичній конструкції. Умовні позначення: М - маркер O'GeneRuler DNA Ladder Mix (ThermoFische Scientific, США), К – контроль ПЛР реакції

Було отримано ампліфікат, що відповідав очікуваному розміру 882 п.н. (рис. 3.10.А) Його використали в якості ДНК-вставки, яку додатково фосфорилювали по 5'-кінцям. В якості вектора використовували rGEX-4T-1, який лінеаризували рестриктазою SmaI (рис. 3.10.Б) та додатково дефосфорилювали по 5'-кінцям. Вектор та вставку лігували, а лігазну суміш використовували для трансформації клітин *E.coli* штаму XL-10 Gold. Відбір клонів з потрібною генетичною конструкцією проводили за допомогою ПЛР з вищезгаданими праймерами N-FNBP1-F та N-FNBP1-R, за допомогою яких виявляли специфічну цільову послідовність у векторі розміром 882 п.н. (рис. 3.10.В). Оскільки при даному підході можливе було утворення конструкцій з оберненою орієнтацією вставки, то паралельно проводили ПЛР, де використовувався праймер GEX-F 5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3', комплементарний до послідовності вектора. У випадку наявності у конструкції цільової вставки в правильній орієнтації ПЛР з праймерами GEX-F та N-FNBP1-R давали ампліфікат розміром 960 п.н. (рис. 3.10.В).

3.2.5. Встановлення взаємодії між N-кінцевим фрагментом FNBP1 та PH доменом білка BCR. Рекombінантний PH домен білка BCR отримували шляхом бактеріальної експресії pET-34a-PH в штамі Rosetta(DE3)pLysS. Для очищення використовували Ni-NTA агарозу (Qiagen, Німеччина), оскільки цей білок мав полігістидинову мітку. Очищений білок мав очікувану молекулярну масу близьку до 47 кДа (рис. 3.11).

Створений вектор pGEX-4T-FNBP1-N експресували в клітинах Rosetta(DE3)pLysS. З них потім виділяли та очищали N-кінцеву частину білка FNBP1. Цей рекombінантний білок мав GST ділянку, що дозволяло очистити цей білок за допомогою глутатіон-сефарози 4В. Молекулярна маса білка становила 63кДа (рис. 3.11). Також в якості негативного контролю експресували за тих самих умов порожній вектор pGEX-4T-1, для отримання білка який складався тільки з GST фрагмента, що має молекулярну масу близько 26 кДа.

Для вивчення взаємодії між PH доменом BCR та N-кінцевою ділянкою білка FNBP1 використали far-вестерн аналіз. Цей метод відбувається як стандартний Вестерн-аналіз, де білок інтересу після гелелектрофорезу переноситься на нітроцелюлозну мембрану, але замість інкубування з антитілами, що мають

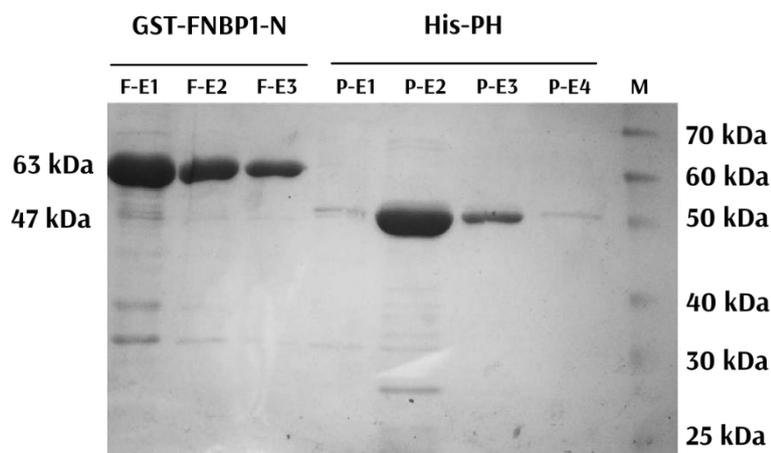


Рис. 3.11. Електрофореграма очищених рекombінантних білків, які відповідають N-кнцевому фрагменту FNBP1 (63 кДа) та PH домену BCR (47 кДа). F-E1-3 - стадії елюції FNBP1-N, P-E1-4 - - стадії елюції PH домену. M – маркер молекулярної ваги PageRuler™ Unstained Protein Ladder

розпізнавати цей білок, інкубують з іншим білком, взаємодію з яким досліджують. Детектування наявного комплексу між білками проводять антитілами до другого білка, з яким інкубували. Відповідно, до цього методу всі виділені білки піддавали електрофорезу в поліакриламідному гелі з наступним переносом на нітроцелюлозну мембрану. Цю мембрану інкубували з рекомбінантним РН доменом, а потім з мишиними антитілами anti-His проти полігістидину, який був присутній лише у РН домену. Вторинні антимишачі антитіла дозволили проявити результат.

Сигнал був присутній в тій зоні мембрани, де в якості контролю роботи антитіл був перенесений рекомбінантний РН домен (~47кДа). Окрім того було виявлено сигнал в зоні, де знаходився рекомбінантний N-кінцевий фрагмент FNBP1 (~63кДа), оскільки цей білок не мав полігістидинової мітки, то це свідчило що з ним зв'язався РН домен, з яким інкубували мембрану (рис. 3.12.). Відсутність сигналу в зоні, де був присутній білок, що складався лише з GST (~26 кДа) вказувала, що GST сам по собі не зв'язував РН домену. Таким чином було підтверджено взаємодію між РН доменом BCR та N-кінцевим фрагментом FNBP1, який містив перші 293 а. з., зокрема F-BAR домен.

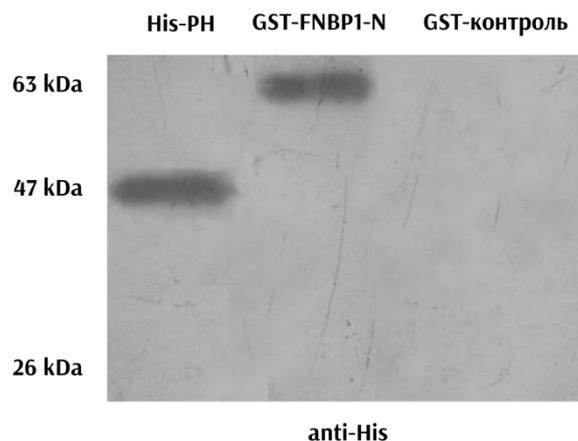


Рис. 3.12. Результати far-вестерн аналізу. Наявність сигналу в районі 63 кДа вказує на те, що N-фрагмент FNBP1 зв'язав РН домен BCR. Сигнал в зоні 47 кДа – контроль антитіл anti-His. Відсутність сигналу в GST-контролі свідчить про те, що виявлене зв'язування не за рахунок GST

3.2.6. Колокалізація FNBP1 з білком BCR в процесі фагоцитозу. Після виявлення зв'язування між частинами білків BCR та FNBP1 наступним логічним кроком було дослідити функціональні наслідки цієї взаємодії. Оскільки білок FNBP1 відіграє важливу роль у вигинанні мембран, наприклад, при фагоцитозі, було доречним вивчити можливу колокалізацію досліджуваних білків в процесі формування фагосоми. Для цього використовували культуру макрофагів J774. Для індукції фагоцитозу до них додавали вбиті і попередньо пофарбовані пропідій йодидом клітини дріжджів. 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. 3.13). 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.

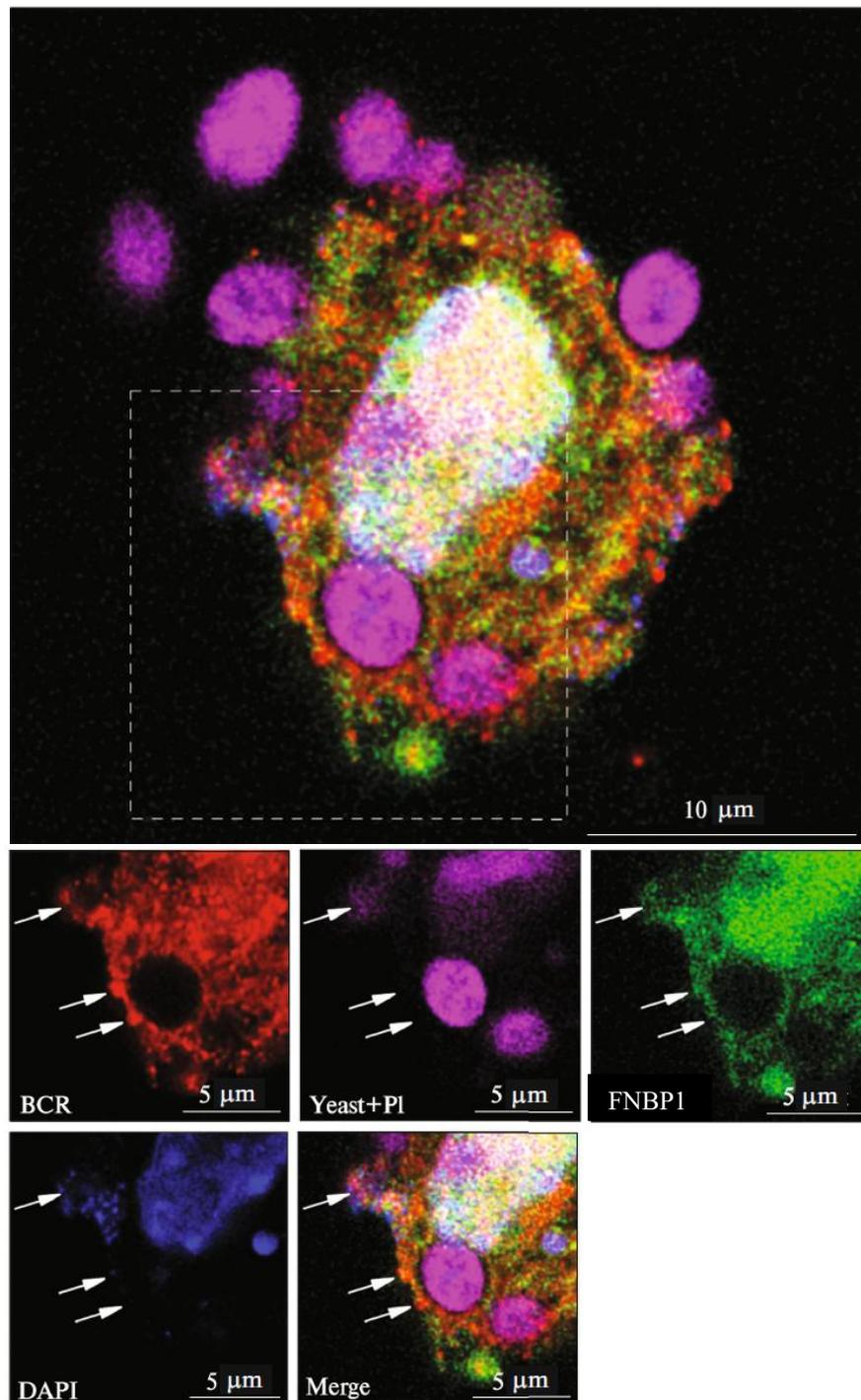


Рис. 3.13. Колокалізація білків BCR та FNBP1 під час фагоцитозу в клітинах J774. Імунофлуоресцентний аналіз із використанням антитіл до BCR (червоний колір) та FNBP1 (зелений колір), накладання сигналів локалізації білків (жовтий колір). Клітини дріжджів були забарвлені пропідій йодидом (фіолетовий колір). Для візуалізації ядер використовували флуоресцентний барвник DAPI (синій колір)

3.2.4. Аналіз сайтів фосфорилювання білка FNBP1. Оскільки BCR є серин-треонін-кіназою, а ABL1 – тирозин-кіназою, то потрібно було оцінити потенційну роль цих кіназних активностей на функціонування FNBP1. Всього в базах даних PhosphoSitePlus та Phospho.ELM була виявлена інформація про сумарно 25 сайтів фосфорилювання (Y234, Y287, T288, T294, S296, S299, S301, S303, S347, S349, S359, S386, S392, S453, S497, Y500, S502, T507, S517, S521, Y522, T523, T537, Y578, Y600). Серед них було 6 тирозинових, 5 треонінових та 14 серинових залишків. Ці всі дані базуються на отриманих експериментально в протеомних дослідженнях з використанням мас-спектрометрії та не дають прямої вказівки на кінази, що відповідальні за фосфорилювання даних сайтів. Взагалі дані щодо регуляції функції білка FNBP1 за допомогою фосфорилювання на даний момент відсутні.

Завдяки інструменту Group-based Prediction System (GPS) 6.0 було передбачено 2 можливі сайти фосфорилювання BCR (S296, S349) та 3 сайти для фосфорилювання ABL1 (Y67, Y287, Y500) (рис. 3.14.).

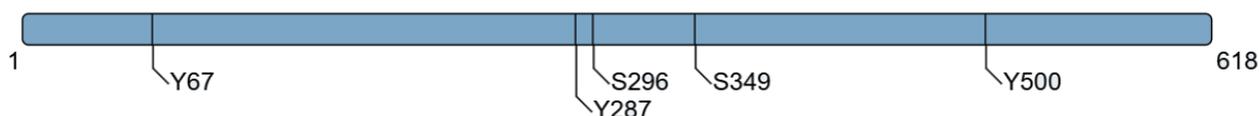


Рис. 3.14. Схема розміщення передбачених сайтів фосфорилювання білка FNBP1 кіназами BCR (S296, S349) та ABL1 (Y67, Y287, Y500)

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

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.

Тютюнникова АП, Кравчук ІВ, Малюта ОВ, Дибков МВ, Малюта СС, Телегеев ГД. Роль Bcr та асоційованих із ним білків у розвитку мієлопроліферативних захворювань. Fakt Eksp Evolucii Org. 2011;11:536–40.

Тютюнникова АП, Лисецька ТЮ, Гур'янов ДС, Кравчук ІВ, Телегеев ГД. Білки, що взаємодіють з PH доменом BCR-ABL, та їхня роль у формуванні пухлинного фенотипу при розвитку мієлопроліферативних захворювань. Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. 2012;3:390–4.

Лисецька ТЮ, Кравчук ІВ, Телегеев ГД. Білок-білкова взаємодія між FBP17 та PH доменом білка Bcr як основа для розуміння деяких механізмів розвитку Ph⁺-позитивних лейкемій. Вісник невідкладної та відновної медицини. 2012;13(1):76–8.

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.

Гур'янов ДС, Лисецька ТЮ, Антоненко СВ, Кравчук ІВ, Телегеев ГД. Роль домену PH білка BCR у клітинних процесах, що визначають фенотип ph⁺-позитивних мієлопроліферативних захворюваннях. Fakt Eksp Evolucii Org. 2014;15:44–8.

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.

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.

3.3. Взаємозв'язок між SMC1A та BCR

3.3.1. Колокалізація SMC1A з білком BCR. Клітини K562 досліджували на предмет колокалізації білків BCR та SMC1A. 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.

За допомогою програмного забезпечення ImageJ Fiji з плагіном JACoP v2.0 зображення розділяли за різні канали та досліджували на предмет накладання сигналів з цих каналів. Це накладання вивчали для різних зрізів отриманих під час мікроскопіювання тих самих клітин. Зрізи, на яких виявляли можливе накладання флуоресцентних сигналів аналізували за рядом критеріїв. Завдяки загаданій програмі розраховували коефіцієнт Пірсона, для оцінки кореляції між сигналами, отриманими з червоного (BCR, BCR-ABL1) та зеленого каналу (SMC1A). Також вираховувались коефіцієнти Мандерса для кожного із каналів, які вказують на те, наскільки частка пікселів з одного каналу перекривається з пікселями другого каналу і навпаки. Ці показники дозволяли оцінювати рівень колокалізації одного білка відносно іншого.

На рисунках 3.15 та 3.16 представлені характерні зображення, отримані з червоного, зеленого, синього каналів та результат їх накладання, які були отримані на зрізах під умовними порядковими номерами 7 та 11, відповідно. На цих зрізах були помічені візуальні ознаки колокалізації. Зрізи відповідали

зображенням з різної глибини сканування конфокального мікроскопа у напрямку від найближчого зрізу до найглибшого відносно покривного скла.

Для 7-го зрізу коефіцієнт кореляції Пірсона становив $r=0,417$, коефіцієнти Мандерса становили $M1=0,335$ (червоний канал), $M2=0,206$ (зелений канал). Такі результати розрахунків вказували на те, що хоча візуально виявлялась наявність колокалізації в певній ділянці клітини, ця колокалізація є статистично не достовірною, оскільки коефіцієнт Пірсона був менше 0,5.

Проте для 11-го зрізу коефіцієнт кореляції Пірсона становив $r=0.703$, а коефіцієнти Мандерса становили $M1=0,493$ та $M2=0,199$ для червоного і зеленого каналів відповідно. Таким чином статистичний аналіз зображень з зеленого та червоного каналів давав достовірний результат колокалізації. Показники коефіцієнтів Мандерса вказували на те, що близько 50% білка BCR

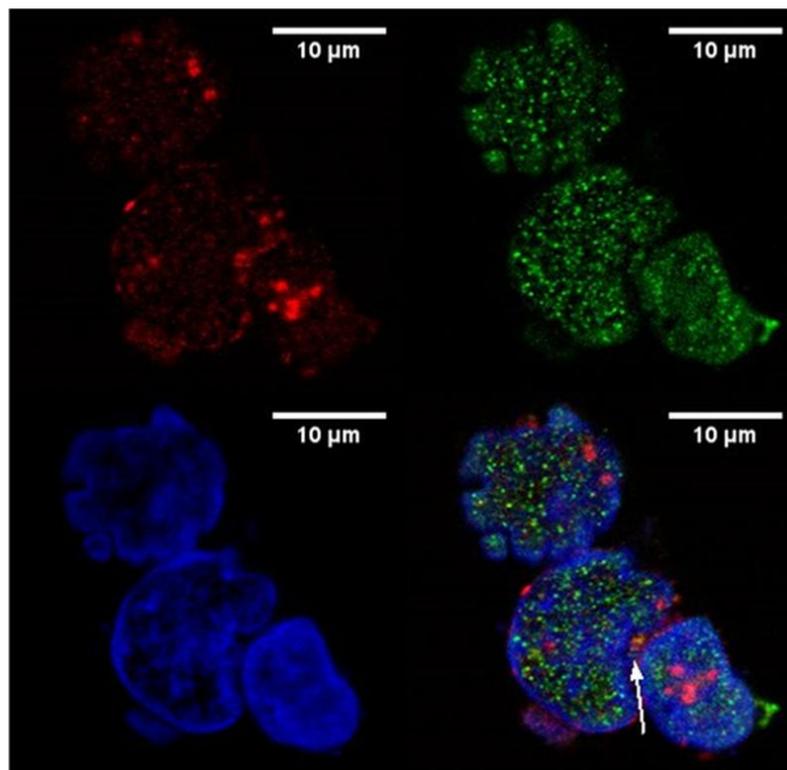


Рис. 3.15. Вивчення можливої колокалізації білків BCR та/або BCR-ABL1 з білком SMC1A в клітинах K562 (зріз 7). Імунофлуоресцентний аналіз із використанням антитіл до BCR (червоний колір) та SMC1A (зелений колір). Для візуалізації ядер використовували флуоресцентний барвник DAPI (синій колір). Стрілкою позначена ділянка візуальної колокалізації

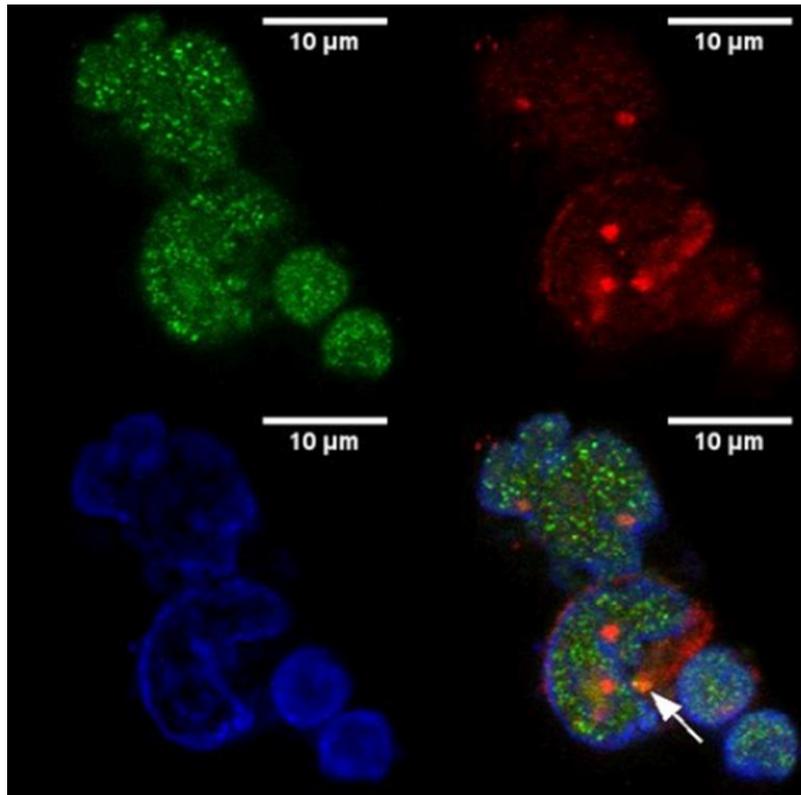


Рис. 3.16. Вивчення можливої колокалізації білків BCR та/або BCR-ABL1 з білком SMC1A в клітинах K562 (зріз 11). Імунофлуоресцентний аналіз із використанням антитіл до BCR (червоний колір) та SMC1A (зелений колір). Для візуалізації ядер використовували флуоресцентний барвник DAPI (синій колір). Стрілкою позначена ділянка візуальної колокалізації

та/або BCR-ABL1 колокалізувалось з білком SMC1A. В той же час частка SMC1A, який колокалізувалась з BCR та/або BCR-ABL1 була близько 20%.

3.3.2. Аналіз сайтів фосфорилювання SMC1A. В базах даних PhosphoSitePlus та Phospho.ELM була наявна інформація про сумарно 46 сайтів фосфорилювання (T28, S85, Y105, Y117, T152, S161, Y168, T182, Y186, S289, S318, Y326, S358, S360, T366, Y441, Y511, Y530, Y575, Y600, Y611, T644, S653, S657, S703, Y714, S715, S717, S735, T841, T946, S951, S956, S957, S962, S964, S966, S970, S971, Y973, T1005, S1033, T1041, S1129, T1217, T1221). Вони були представлені 13 тирозиновими, 11 треоніновими та 22 сериновими амінокислотними залишками.

Більшість з цих сайтів виявлені лише експериментально з використанням мас-спектрометрії під час дослідження протеомів. Проте для сайтів S358, S360, S951, S957, S966 також було показано, що вони є мішенями для фосфорилування білком ATM. Це фосфорилування було важливим для пригнічення транскрипції та реплікації ДНК у випадку дволанцюгових розривів та загалом сприяло відновленню після дії іонізуючого випромінювання (201).

Передбачення можливих сайтів фосфорилування для BCR та ABL1 за допомогою GPS 6.0 виявило лише 3 потенційні сайти для фосфорилування ABL1 кіназою (Y511, Y600, Y1085) (рис. 3.17.). Необхідні подальші дослідження для того, щоб експериментально виявити таке фосфорилування та з'ясувати його функціональну роль для SMC1A.



Рис. 3.17. Схема розміщення передбачених сайтів фосфорилування білка SMC1A кіназою ABL1

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

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 Anstruct Book. p. 1663.

3.4. Перші етапи вивчення взаємодії між HSPB1 та BCR

3.4.1. Створення генетичної конструкції рЕТ-42-HSPB1 та її експресія.

Для створення конструктора, яка б дозволяла отримати рекомбінантний повномірний білок HSPB1, було взято вектор рЕТ-42а, що кодує GST та полігістидинові мітки. За допомогою ПЛР з праймерами специфічними до послідовності, яка кодує HSPB1, Н-f 5'-TATAGGATCCGAGTCAGCCAGCATGACC-3' та Н-r 5'-TATAGAATTCTTACTTGGCGGCAGTCTC-3'. Ці праймери також містили сайти для ендонуклеаз рестрикції: BamHI - на прямому та EcoRI – на зворотньому, відповідно. В якості вихідної матриці була використана генетична конструкція рОТВ7-Hsp27, з вбудованою кДНК повнорозмірного HSPB1. Отримали ампліфікат, що відповідав очікуваному розміру близько 650 п.н. (рис. 3.18.а).

ПЛР-продукт та вектор рЕТ-42а розрізали ендонуклеазами рестрикції BamHI та EcoRI та проводили лігування. Лігасну суміш трансформували в *E.coli* штаму XL-10 Gold. З отриманих клонів виділяли плазмідну ДНК та виявляли потрібну генетичну конструкцію за допомогою праймерів Н-f та Н-r (рис. 3.18.б).

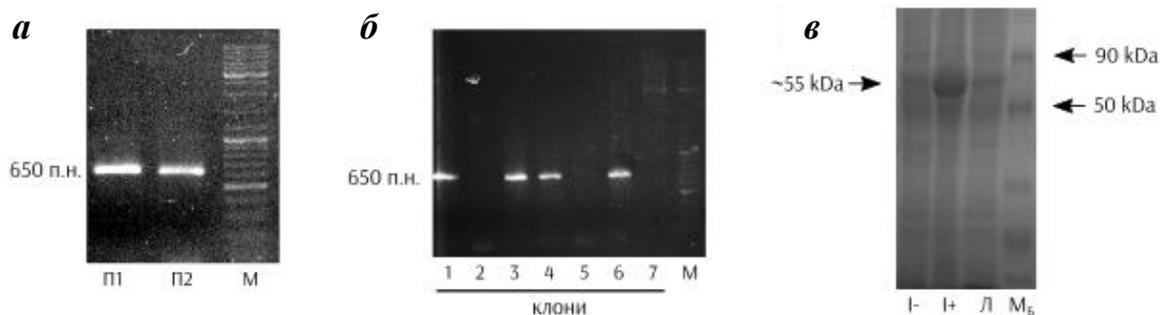


Рис. 3.18. Створення рЕТ-42-HSPB1. *а* – ПЛР-продукт, що відповідав цільовій послідовності, що кодує HSPB1, *б* – ПЛР аналіз на наявність вставки у створеній генетичній конструкції.; *в* – бактеріальна експресія рЕТ-42-HSPB1. Умовні позначення: П1,П2 – ампліфікати із послідовністю, яка кодує HSPB1, 1-7 – отримані клони, М – ДНК маркер O'GeneRuler DNA Ladder Mix (ThermoFisher Scientific, США), I- до індукції, I+ після індукції, Л – просвітлений лізат, М_б – білковий маркер

Отриману генетичну конструкцію рЕТ-42-HSPB1 експресували в штамі Rosetta(DE3)pLysS. Було отримано видиму смугу синтезованого рекомбінантного білка очікуваного розміру близько 55 кДа (рис. 3.18.в). 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.

3.4.2. Аналіз сайтів фосфорилювання HSPB1. Для білка HSPB1 в базах даних PhosphoSitePlus та Phospho.ELM була виявлено інформацію про 30 сайтів фосфорилювання (S9, S15, Y23, S26, Y54, S65, Y73, S74, S78, S82, S83, S86, T91, S98, T113, T121, Y133, S135, T139, Y142, T143, T162, T164, T174, S176, T180, T184, S187, S199, T202). Серед них 5 становили тирозинові, 11 - треонінові та 14 - серинові залишки.

Для деяких з цих сайтів існує достатньо експериментальних даних щодо їх ролі у функціонуванні HSPB1. Основні відомі сайти фосфорилювання HSPB1 — це серини 15, 78 і 82. Фосфорилювання цих залишків регулює олігомеризацію HSPB1, тобто його здатність формувати великі мультимерні комплекси. У нефосфорилюваному стані HSPB1 існує у вигляді великих олігомерів, тоді як фосфорилювання по серинах 15, 78 і 82 призводить до дисоціації цих олігомерів на менші комплекси (202). Крім того, фосфорилювання цих серинових залишків впливає на інші клітинні функції HSPB1, зокрема на архітектуру цитоскелету, клітинну міграцію, виживання клітин, диференціацію, стабілізацію мРНК і навіть участь у прогресуванні пухлин (203).

GPS 6.0 застосовували для передбачення потенційних сайтів фосфорилювання в послідовності білка HSPB1. Для серин/треонінкінази BCR було передбачено 1 можливий сайт в положенні S199. В свою чергу для тирозинкінази ABL1 було передбачено потенційні 2 сайти (Y54 та Y142) (рис. 3.19.).

Необхідні подальші дослідження для того, щоб експериментально виявити таке фосфорилювання та з'ясувати його функціональну роль для SMC1A.



Рис. 3.19. Схема розміщення передбачених сайтів фосфорилювання білка HSPB1 кінзами BCR (S199) та ABL1(Y54, Y142)

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

Малюта ОВ, Кравчук ІВ, Тютюнникова АП, Лисецька ТЮ, Дибков МВ, Телегеев ГД. Структурно-функціональна роль доменів PH і C2 білка Bcr/Abl в розвитку Ph-позитивних лейкемій. In: Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології. Київ; 2010. р. 115–6.

Antonenko SV, Kravchuk IV, Gurianov DS, Telegeev GD. Білки-партнери PH домену протеїна BCR-ABL: створення генетичних конструкцій для виявлення молекулярних особливостей розвитку ХМЛ. *Fakt Eksp Evolucii Org.* 2017;20:47–52.

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.

3.5. 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 лейкемічних 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 лейкемічних 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

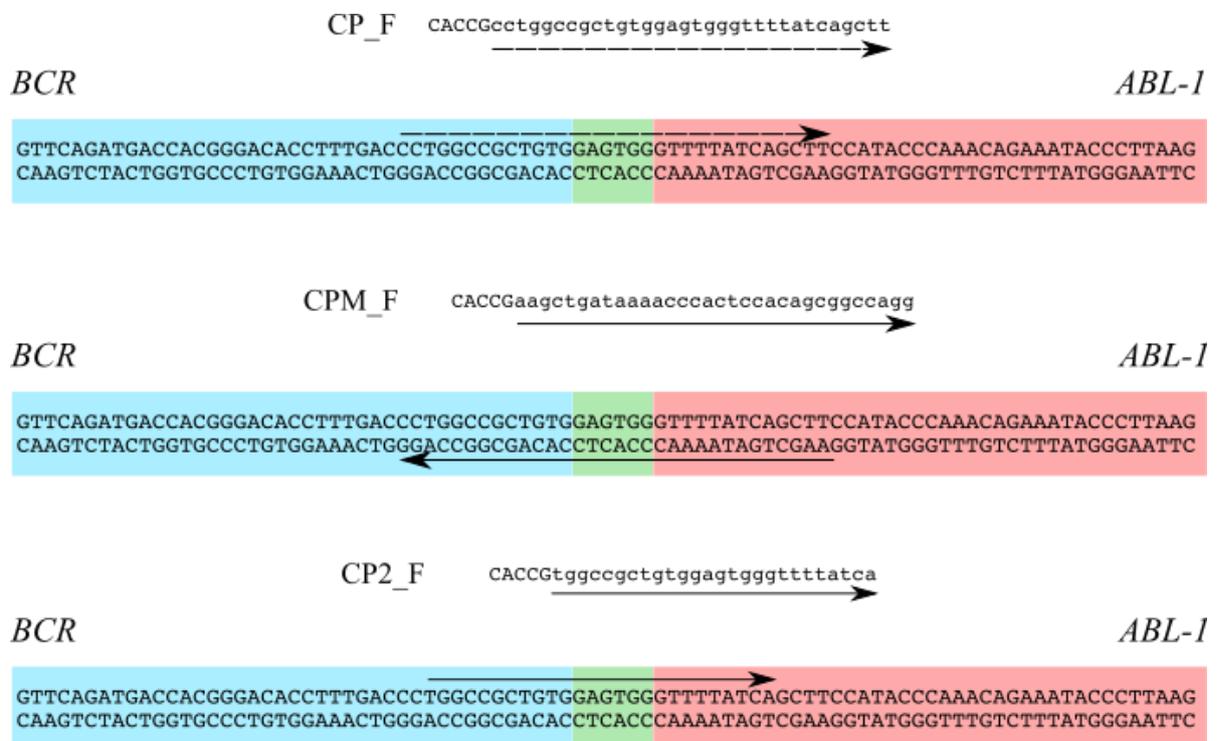


Рис. 3.20. Нуклеотидна послідовність злиття генів *BCR* та *ABL1* в геномі клітин K562 з підібраними олігонуклотидами

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 генетичних конструкцій для випробування CRISPR-Cas9 на обраних клітинах K562 (рис. 3.20). Такі конструкції були успішно створені, що перевіряли за допомогою ПЛР.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

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.

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Ця робота в більшості своїй була присвячена дослідженням C2 та PH доменів білка BCR. Знання про їх структуру та функцію мають не лише фундаментальне значення для розуміння ролі білка BCR в житті клітин, але вони також дозволяють розширити уявлення про злочасний зсув молекулярних процесів, який спричинений появою аномального BCR-ABL1. Співставлення деталізованої картини норми та патології є хорошим підґрунтям для виявлення перспективних точок для розробки нових таргетних терапій, спрямованих проти онкогематологічних захворювань, опосередкованих перебудовою *BCR-ABL1*. З огляду на відомий феномен розвитку резистентності ракових клітин до застосовуваних видів лікування, процес пошуку нових мішеней залишається завжди актуальним. Робота над створенням конструкцій на основі CRISPR-Cas системи націлених на точку розриву в *BCR-ABL1* були першими кроками дослідити можливість та потенціал розвитку альтернативного підходу до лікування через корегування хромосомної транслокації.

Тривимірна структура C2 домена білка BCR на даний момент не є встановленою експериментально. Тому кінцевим завданням цієї частини роботи було отримання рекомбінантного C2 домена, що дозволив би дослідити його структурно-функціональні властивості. На шляху до цього нами було спочатку проведено передбачення вторинної та третинної структур на основі відомої амінокислотної послідовності. Базуючись на цих передбаченнях, межі C2 домена були визначені з 903 до 1037 а.з. білка BCR. Такий діапазон дещо відрізнявся від запропонованих у відомих базах даних UniProt та NCBI. Згідно з даними експериментально підтверджених структур доменів C2 з інших білків, для цих доменів характерним є формування бета-сендвічу, зібраного з двох чотириланцюгових бета-листіків (93–95). Результати передбачення структури для вибраного відрізка послідовності давали найбільш відповідну для C2 доменів структуру. Серед відомих структур доменів C2 інших білків вирізняють два типи

можливих топологій на основі варіанті укладки бета-ланцюгів (68,197,198). Згідно з передбаченнями третинної структури, C2 домен BCR може належати до II типу топології (рис. 3.2.). На основі визначеної послідовності було успішно створено генетичну конструкцію для бактеріальної експресії рЕТ-28-C2. Дана конструкція дозволила отримати рекомбінантний білок, що відповідав C2 білка BCR.

Очищений рекомбінантний C2 домен досліджували за допомогою методу кругового дихроїзму, щоб експериментально оцінити відповідність вторинної структури білка очікуваним. Отримані дані спектра кругового дихроїзму свідчать про те, що рекомбінантний білок мав вміст вторинної структури, подібний до того, що можна очікувати від домена C2. Зокрема було виявлено домінування антипаралельних бета-ланцюгів у вторинній структурі. На основі спектру на сервері BeStSel (78–82) було ідентифіковано, що за класифікацією CATH рекомбінантний C2 належить до типу топології Immunoglobulin-like (2.60.40), до якого належить і суперсімейство C2 доменів (2.60.40.150) (97). Таким чином отриманий рекомбінантний C2 цілком може мати характерну структуру та може бути використаний для подальших досліджень.

Можливість зв'язування ліпідів є однією з найбільш помітних особливостей багатьох доменів C2. Ця властивість помітно впливає на функціонування білків, що мають в своєму складі C2 домен, адже він може направляти весь білок до конкретних мембранних структур клітин. Оскільки розподіл ліпідів у різних мембранах клітини є дуже різноманітним та асиметричним, то специфічність зв'язування C2 домена забезпечує унікальну клітинну локалізацію всього білка. Цей опосередкований C2 доменом рекрутинг білка до специфічних мембран клітини може в деяких випадках може бути Ca^{2+} -залежним. Тому функціонування білка з C2 доменом в визначеному клітинному компартменті може регулюватись кальцієвим сигналігом. Проте відомі також приклади C2 доменів, які зв'язують ліпіди без іонів Ca^{2+} як посередника (94).

Отриманий рекомбінантний C2 домен білка BCR використали для виявлення можливого зв'язування з фосфоліпідами. Білок інкубували з

мембраною, на яку були нанесені різні фосфоліпіди, після чого детектували взаємодії антитілами специфічними до рекомбінантного білка. Всього було виявлено взаємодію C2 домена з вісьмома різними фосфоліпідами: фосфатидилінозитол-3-фосфатом (PI(3)P), фосфатидилінозитол-4-фосфатом (PI(4)P), фосфатидилінозитол-5-фосфатом (PI(5)P), фосфатидилінозитол-3,4-біфосфатом (PI(3,4)P₂), фосфатидилінозитол-3,5-біфосфатом (PI(3,5)P₂), фосфатидилінозитол-4,5-біфосфатом (PI(4,5)P₂), фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфатом (PI(3,4,5)P₃) і фосфатидилсерином (PS).

Специфічне зв'язування з фосфоліпідами може бути ключем до розуміння локалізації та функціонування як білка BCR, так і його химерної форми BCR-ABL1. Як було вже зазначено, фосфоліпіди розподілені з чіткою характерною асиметрією між різними мембранними органелами клітини. PI(3)P в основному міститься в ранніх ендосомах (204,205). PI(4)P широко поширений в апараті Гольджі та плазматичній мембрані (205,206). PI(5)P можна знайти в багатьох відділах клітини, включаючи плазматичну мембрану, ядро, ендолізосомальну систему та апарат Гольджі (204,207). Загалом усі виявлені фосфатидилінозитолі відіграють важливу роль в організації багатьох клітинних процесів, включаючи транспортування везикул, організацію цитоскелета, ендоцитоз і фагоцитоз (204,206–208). Фосфатидилсерин знаходиться головним чином на внутрішній стороні плазматичної мембрани за нормальних умов, але переміщується на зовнішню, коли відбувається активація апоптозу. Він також бере участь у процесах передачі клітинних сигналів (204,209,210).

Слід зазначити, що білок BCR також включає домен PH, який, як було продемонстровано, зв'язує PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P (5). Можна очікувати, що домени PH і C2 можуть синергійно посилювати зв'язування ліпідів цілого білка і, як наслідок, його залучення до певних мембранних структур. В свою чергу у гібридних варіантах білка BCR-ABL1 відсутність або наявність доменів PH і C2 змінює клітинну локалізацію цих білків порівняно з нормальним BCR. Отримані дані можуть лягти в основу для майбутнього з'ясування функцій BCR. Наприклад, в даній роботі виявлена спільна локалізація BCR з FNBP1 на

фагосомах. Цілком імовірно, що первинний рекрутинг BCR до фагосом може бути частково пов'язаний зі зв'язуванням характерних для даної структури фосфоліпідів. А після релокації BCR можливі інші події, наприклад, білок-білкові взаємодії та фосфорилування за рахунок кіназної активності. Відомо, що PI(4,5)P₂, який як тут було показано може взаємодіяти з C2 доменом, є важливим детермінантом при фагоцитозі (204,208,211). Зростання рівнів цього фосфоліпиду в мембрані впливає на цілий ряд процесів необхідних для формування фагосоми, наприклад підвищує полімеризації актину в основі фагоцитної чаші (212). Недостача PI(4,5)P₂ знижує фагоцитарну ефективність (204,213).

Фосфоліпиди, які ми ідентифікували як такі, що взаємодіють з доменом C2 BCR, є аніонними ліпідами. Механізм спорідненості до цих ліпідів може бути заснований на електростатичній взаємодії з негативно зарядженими фосфатидильними групами. Для багатьох C2 доменів іони Ca²⁺ з їх позитивним зарядом виступають в ролі посередників у зв'язуванні з фосфоліпідами. Дослідження, проведене в даній роботі, не надає жодних переконливих аргументів щодо можливого впливу Ca²⁺ на виявлене зв'язування фосфоліпідів. Іони кальцію не додавались навмисно до використаних буферів, але в той же час не було вжито спеціальних заходів для усунення можливого незначного забруднення Ca²⁺. Додатковий аналіз амінокислотних послідовностей C2 домена також не дозволив дати однозначної відповіді щодо залежності цього домену від іонів кальцію. В будь-якому випадку остаточне рішення повинно ґрунтуватися на майбутніх експериментальних перевірках.

Іншим важливим аспектом цієї дисертаційної роботи було вивчення білок-білкових взаємодій між PH доменом BCR та білками FNBP1, SMC1A та HSPB1.

Завдяки спільній експресії FNBP1 та PH домена BCR в еукаріотичних клітинах 293T було виявлено їх коімунопреципітацію. 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. Тому виявлена коімунопреципітація цілком могла відбутись за посередництва будь-якого додаткового білка, який не детектувався в даних

експериментах, а тому міг залишитись непоміченим. Таким чином, цей результат може вказувати на можливу взаємодію у складі білкових комплексів.

Для того, щоб продемонструвати безпосередню взаємодію між FNBP1 та РН доменом було вирішено провести дослідження взаємодії в умовах *in vitro*. Для цього було успішно створено генетичну конструкцію для бактеріальної експресії та на її основі отримано рекомбінантний повнорозмірний FNBP1. З цим білком методом пулдауну було підтверджено вже безпосередню взаємодію між FNBP1 та РН доменом BCR. Для ідентифікації тої частини FNBP1, яка може бути відповідальною за таку взаємодію, додатково було створено генетичну конструкцію, яка кодувала лише N-кінцевий регіон цього білка. Очищений рекомбінантний фрагмент білка FNBP1 взаємодіяв з РН доменом BCR, що було підтверджено методом far-Вестерн блот аналізу. 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.

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 клітини вбитих дріжджів, що служили об'єктом для фагоцитозу. У клітинах, у яких відбувалось захоплення клітин дріжджів та формування фагосом, виявляли спільну колокалізацію білків BCR та FNBP1. Слід відзначити, що використані J774 є мишиними макрофагами, а тому співлокалізація була продемонстрована для мишачих білків BCR та FNBP1. Співпадіння між амінокислотними послідовностями людських FNBP1 і BCR та послідовностями

їх мишачих аналогів становить 94%. Тобто ці білки є достатньо консервативними. Зокрема антитіла, які використовувались, були однаково специфічними як для людських, так і мишачих 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.

Слід також відмітити, що важливим характерним фосфоліпідом, який представлений у мембрані фагосом є фосфатидилінозитол 4,5-біфосфат (PI(4,5)P₂), з яким взаємодіє F-BAR домен білка FNBP1 (94). Сам з частиною білка, яка містить F-BAR домен, як було показано в цій роботі взаємодіє PH домен BCR. Додатково слід згадати, що також в цій роботі було показано, що з даним фосфоліпідом взаємодіє і C2 домен BCR. Таким чином ці отримані результати взаємодоповнюють одне одного.

Нами було біоінформатично передбачено наявність у білку FNBP1 двох можливих сайтів фосфорилування BCR (S296, S349). Це може вказувати напрямок можливого пошуку механізмів впливу нормального BCR на FNBP1. Крім цього було виявлено три сайти для фосфорилування ABL1 (Y67, Y287, Y500). А це вже може свідчити про можливі точки впливу для гібридного BCR-ABL1, за рахунок наявності ABL1. Причому це можливо лише для тих варіантів BCR-ABL1, які мають у своєму складі PH домен, за допомогою якого відбувається білок-білкова взаємодія, а це довгі варіанти p210 та p230. Для останнього з цих двох варіантів також можливе більш сильне рекрутування BCR-ABL1 до мембрани фагосоми за рахунок наявного C2 домена, який відсутній у інших формах химерних онкобілків.

Попередні дослідження нашого відділу вже встановлювали взаємодію PH домену BCR з SMC1A методом пулдауну (5). В продовження цієї роботи нами було проведено дослідження колокалізації SMC1A та BCR в клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії K562. Оскільки в цих клітинах присутній також і BCR-ABL1, то антитіла, які використовувались, детектували одночасно і нормальний BCR, і гібридний BCR-ABL1, не відрізняючи один від одного. Загалом було виявлено

окремі регіони в клітині, для яких достовірно реєструвалась співлокалізація досліджуваних білків. 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. В цій роботі для послідовності SMC1A були біоінформатично передбачені лише 3 сайти для фосфорилування ABL1. Тому, можливо, взаємодія саме довгих варіантів BCR-ABL1 за посередництва PH домена може через фосфорилування тирозинів SMC1A якимось чином впливати на його функцію.

Для дослідження взаємодії PH домена BCR з білком HSPB1 було створено генетичну конструкцію для бактеріальної експресії. Було отримано біосинтез білка в клітинах *E.coli* штаму Rosetta(DE3)pLysS, проте необхідне подальша оптимізація експресії та очистки білка. Цікаво, що білок HSPB1 може олігомеризуватись в клітині, якщо він не є фосфорильований, що свідчить про важливу роль цієї модифікації в його функціонуванні. Тому нами було проведено аналіз потенційних сайтів фосфорилування. Для серин-треонін-кінази BCR було передбачено 1 можливий сайт в положенні S199. В свою чергу для тирозин-кінази ABL1 було передбачено потенційні 2 сайти (Y54 та Y142).

Розроблено схему аналізу для підбору мішеней для системи CRISPR-Cas9, що націлена на місце розриву хромосомної транслокації. Цей підхід був застосований для підбору та створення конструкції проти точки розриву *BCR-ABL1* в геномі клітин K562. В майбутньому передбачається випробування створених конрукції на цій культурі ХМЛ клітин. Цей підхід є перспективним як для вивчення фундаментальних процесів онкогенезу спричиненого філадельфійською хромосоною, так і для можливих експериментів щодо розробки нових потенційних підходів подолання Ph'-позитивних лейкемій.

ВИСНОВКИ

Вивчення структурно-функціональних особливостей C2 домену та білок-білкових взаємодій PH домена 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 у 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 рЕТ-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.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Федоренко ЗП, Сумкіна ОВ, Горох ЄЛ, Гулак ЛО, Рижов АЮ, Зуб ВО, et al. Рак в Україні, 2022 - 2023 Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Бюлетень Національного канцер-реєстру України [Internet]. 2024;(25). Available from: http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_25/index.htm
2. Adnan-Awad S, Kim D, Hohtari H, Javarappa KK, Brandstoetter T, Mayer I, et al. Characterization of p190-Bcr-Abl chronic myeloid leukemia reveals specific signaling pathways and therapeutic targets. *Leukemia*. 2021 Jul;35(7):1964–75.
3. Awad SA, Hohtari H, Javarappa KK, Brandstoetter T, Kim D, Potdar S, et al. BCR-ABL1 p190 in CML: A Minor Breakpoint with a Major Impact. *Blood*. 2019 Nov 13;134(Supplement_1):190.
4. Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, et al. Neutrophilic-Chronic Myeloid Leukemia: A Distinct Disease With a Specific Molecular Marker (*BCR/ABL* With C3/A2 Junction). *Blood*. 1996 Oct 1;88(7):2410–4.
5. Miroshnychenko D, Dubrovska A, Maliuta S, Telegeev G, Aspenström P. Novel role of pleckstrin homology domain of the Bcr-Abl protein: Analysis of protein–protein and protein–lipid interactions. *Exp Cell Res*. 2010 Feb 15;316(4):530–42.
6. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome Studies on Normal and Leukemic Human Leukocytes. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 1960 Jul 1;25(1):85–109.
7. Sherbenou DW, Druker BJ. Applying the discovery of the Philadelphia chromosome. *J Clin Invest*. 2007 Aug 1;117(8):2067–74.
8. Rowley JD. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature*. 1973 Jun;243(5405):290–3.

9. ABL1 ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2025 May 26]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25>
10. Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, et al. Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics *. *Mol Cell Proteomics*. 2014 Feb 1;13(2):397–406.
11. Irgit A, Kamis R, Sever B, Tuyun AF, Otsuka M, Fujita M, et al. Structure and Dynamics of the ABL1 Tyrosine Kinase and Its Important Role in Chronic Myeloid Leukemia. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2025 May 1;358(5):e70005.
12. Colicelli J. ABL Tyrosine Kinases: Evolution of Function, Regulation, and Specificity. *Sci Signal*. 2010 Sep 14;3(139):re6–re6.
13. Huang Y, Comiskey EO, Dupree RS, Li S, Koleske AJ, Burkhardt JK. The c-Abl tyrosine kinase regulates actin remodeling at the immune synapse. *Blood*. 2008 Jul 1;112(1):111–9.
14. Brown S, Hutchinson CV, Aspinall-O’Dea M, Whetton AD, Johnson SM, Rees-Unwin K, et al. Monocyte-derived dendritic cells from chronic myeloid leukaemia have abnormal maturation and cytoskeletal function that is associated with defective localisation and signalling by normal ABL1 protein. *Eur J Haematol*. 2014;93(2):96–102.
15. Hantschel O, Nagar B, Guettler S, Kretschmar J, Dorey K, Kuriyan J, et al. A Myristoyl/Phosphotyrosine Switch Regulates c-Abl. *Cell*. 2003 Mar 21;112(6):845–57.
16. Resh MD. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 1999 Aug 12;1451(1):1–16.

17. Daley GQ, Van Etten ,Richard A., Jackson ,Peter K., Bernards ,Andre, and Baltimore D. Nonmyristoylated Abl Proteins Transform a Factor-Dependent Hematopoietic Cell Line. *Mol Cell Biol.* 1992 Apr 1;12(4):1864–71.
18. ABL1 protein expression summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2025 May 28]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000097007-ABL1>
19. Van Etten RA. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol.* 1999 May 1;9(5):179–86.
20. Wen ST, Jackson PK, Van Etten RA. The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products. *EMBO J.* 1996 Apr;15(7):1583–95.
21. UniProt [Internet]. 2021 [cited 2025 May 28]. UniProt - ABL1. Available from: https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00519/entry#family_and_domains
22. Taagepera S, McDonald D, Loeb JE, Whitaker LL, McElroy AK, Wang JYJ, et al. Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci.* 1998 Jun 23;95(13):7457–62.
23. Panjarian S, Iacob RE, Chen S, Engen JR, Smithgall TE. Structure and Dynamic Regulation of Abl Kinases*. *J Biol Chem.* 2013 Feb 22;288(8):5443–50.
24. Donaldson LW, Gish G, Pawson T, Kay LE, Forman-Kay JD. Structure of a regulatory complex involving the Abl SH3 domain, the Crk SH2 domain, and a Crk-derived phosphopeptide. *Proc Natl Acad Sci.* 2002 Oct 29;99(22):14053–8.
25. Gosser YQ, Zheng J, Overduin M, Mayer BJ, Cowburn D. The solution structure of Abl SH3, and its relationship to SH2 in the SH(32) construct. *Structure.* 1995 Oct 1;3(10):1075–86.

26. Pisabarro MT, Serrano L, Wilmanns M. Crystal structure of the abl-SH3 domain complexed with a designed high-affinity peptide ligand: implications for SH3-ligand interactions. *J Mol Biol.* 1998 Aug 21;281(3):513–21.
27. Paladini J, Maier A, Habazettl JM, Hertel I, Sonti R, Grzesiek S. The molecular basis of Abelson kinase regulation by its α I-helix. Dötsch V, editor. *eLife.* 2024 Apr 8;12:RP92324.
28. Otsuka FAM, Bjelic S. Evaluation of residue variability in a conformation-specific context and during evolutionary sequence reconstruction narrows drug resistance selection in Abl1 tyrosine kinase. *Protein Sci.* 2022;31(7):e4354.
29. Chan WW, Wise SC, Kaufman MD, Ahn YM, Ensinger CL, Haack T, et al. Conformational Control Inhibition of the BCR-ABL1 Tyrosine Kinase, Including the Gatekeeper T315I Mutant, by the Switch-Control Inhibitor DCC-2036. *Cancer Cell.* 2011 Apr 12;19(4):556–68.
30. Wu A, Liu X, Fruhstorfer C, Jiang X. Clinical Insights into Structure, Regulation, and Targeting of ABL Kinases in Human Leukemia. *Int J Mol Sci.* 2024 Jan;25(6):3307.
31. De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Rowe D, Bown N, Morel F, Berthou C, et al. ABL1 fusion genes in hematological malignancies: a review. *Eur J Haematol.* 2011;86(5):361–71.
32. Blakes AJM, Gaul E, Lam W, Shannon N, Knapp KM, Bicknell LS, et al. Pathogenic variants causing ABL1 malformation syndrome cluster in a myristoyl-binding pocket and increase tyrosine kinase activity. *Eur J Hum Genet.* 2021 Apr;29(4):593–603.
33. Schoepfer J, Jahnke W, Berellini G, Buonamici S, Cotesta S, Cowan-Jacob SW, et al. Discovery of Asciminib (ABL001), an Allosteric Inhibitor of the Tyrosine Kinase Activity of BCR-ABL1. *J Med Chem.* 2018 Sep 27;61(18):8120–35.

34. Wang JYJ. The Capable ABL: What Is Its Biological Function? *Mol Cell Biol.* 2014 Apr 1;34(7):1188–97.
35. Burger K, Schlackow M, Gullerova M. Tyrosine kinase c-Abl couples RNA polymerase II transcription to DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 2019 Apr 23;47(7):3467–84.
36. Hu H, Bliss JM, Wang Y, Colicelli J. RIN1 Is an ABL Tyrosine Kinase Activator and a Regulator of Epithelial-Cell Adhesion and Migration. *Curr Biol.* 2005 May 10;15(9):815–23.
37. Greuber EK, Smith-Pearson P, Wang J, Pendergast AM. Role of ABL family kinases in cancer: from leukaemia to solid tumours. *Nat Rev Cancer.* 2013 Aug;13(8):559–71.
38. Dasgupta Y, Koptyra M, Hoser G, Kantekure K, Roy D, Gornicka B, et al. Normal ABL1 is a tumor suppressor and therapeutic target in human and mouse leukemias expressing oncogenic ABL1 kinases. *Blood.* 2016 Apr 28;127(17):2131–43.
39. Golovine K, Abalakov G, Lian Z, Chatla S, Karami A, Chitralla KN, et al. ABL1 kinase as a tumor suppressor in AML1-ETO and NUP98-PMX1 leukemias. *Blood Cancer J.* 2023 Mar 23;13(1):42.
40. Khatri A, Wang J, Pendergast AM. Multifunctional Abl kinases in health and disease. *J Cell Sci.* 2016 Jan 1;129(1):9–16.
41. Liu R, Kong W, Jiang Z, Zheng S, Yuan X, Ye L. ABL1 Is a Prognostic Marker and Associated with Immune Infiltration in Hepatocellular Carcinoma. *J Oncol.* 2021;2021(1):1379706.
42. Wang X, Charng WL, Chen CA, Rosenfeld JA, Al Shamsi A, Al-Gazali L, et al. Germline mutations in ABL1 cause an autosomal dominant syndrome

- characterized by congenital heart defects and skeletal malformations. *Nat Genet.* 2017 Apr;49(4):613–7.
43. Stuardo Castillo NG. Role of Abl1 kinase in axon initial segment disassembly and its consequences on axonal trafficking in Alzheimer's disease. In: Pontificia Universidad Católica de Chile Facultad de Ciencias Biológicas, editor. 2024 [cited 2025 Jun 24]. Available from: <https://repositorio.uc.cl/handle/11534/86434>
44. Malmberg EK, Andersson CX, Gentsch M, Chen JH, Mengos A, Cui L, et al. Bcr (breakpoint cluster region) protein binds to PDZ-domains of scaffold protein PDZK1 and vesicle coat protein Mint3. *J Cell Sci.* 2004 Nov 1;117(23):5535–41.
45. Sacharidou A, Chambliss K, Chu H, Lee WR, Xu L, Shaul PW, et al. Abstract MP40: Breakpoint Cluster Region Protein Function As A Kinase Mediates The Atheroprotective Actions Of Hdl In Vascular Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021 Sep;41(Suppl_1):AMP40–AMP40.
46. BCR protein expression summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2025 May 29]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000186716-BCR>
47. McWhirter JR, Galasso ,Debora L., and Wang JYJ. A Coiled-Coil Oligomerization Domain of Bcr Is Essential for the Transforming Function of Bcr-Abl Oncoproteins. *Mol Cell Biol.* 1993 Dec 1;13(12):7587–95.
48. He Y, Wertheim JA, Xu L, Miller JP, Karnell FG, Choi JK, et al. The coiled-coil domain and Tyr177 of bcr are required to induce a murine chronic myelogenous leukemia-like disease by bcr/abl. *Blood.* 2002 Apr 15;99(8):2957–68.
49. Smith KM, Yacobi R, Etten RAV. Autoinhibition of Bcr-Abl through Its SH3 Domain. *Mol Cell.* 2003 Jul 1;12(1):27–37.

50. Maru Y, Witte ON. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell*. 1991 Nov 1;67(3):459–68.
51. Liu J, Wu Y, Yun M, Guo Zhen, Lu Dai, Haataja Leena, Heisterkamp Nora, et al. Inhibition of Bcr Serine Kinase by Tyrosine Phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 1996 Mar 1;16(3):998–1005.
52. Wu Y, Liu J, Arlinghaus RB. Requirement of two specific tyrosine residues for the catalytic activity of Bcr serine/threonine kinase. *Oncogene*. 1998 Jan;16(1):141–6.
53. Li J, Smithgall TE. Co-expression with BCR Induces Activation of the FES Tyrosine Kinase and Phosphorylation of Specific N-terminal BCR Tyrosine Residues *. *J Biol Chem*. 1996 Dec 20;271(51):32930–6.
54. Perazzona B, Lin H, Sun T, Wang Y, Arlinghaus R. Kinase domain mutants of Bcr enhance Bcr-Abl oncogenic effects. *Oncogene*. 2008 Apr;27(15):2208–14.
55. Reckel S, Gehin C, Tardivon D, Georgeon S, Kükenshöner T, Löhr F, et al. Structural and functional dissection of the DH and PH domains of oncogenic Bcr-Abl tyrosine kinase. *Nat Commun*. 2017 Dec 13;8(1):2101.
56. Miroshnychenko D, Teleheiev HD, Maliuta S. [Analysis of GEF activity of Bcr protein DH domain]. *Ukr Biokhim Zh* [Internet]. 2007 Sep 1 [cited 2025 Jun 24]; Available from: https://www.semanticscholar.org/paper/%5BAnalysis-of-GEF-activity-of-Bcr-protein-DH-Miroshnychenko-Teleheiev/b52917e87eef7596bef5282019bb1fe1caa55983?utm_source=consensus
57. Korus M, Mahon GM, Cheng L, Whitehead IP. p38 MAPK-mediated activation of NF- κ B by the RhoGEF domain of Bcr. *Oncogene*. 2002 Jul;21(30):4601–12.

58. Diekmann D, Brill S, Garrett MD, Totty N, Hsuan J, Monfries C, et al. Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature*. 1991 May;351(6325):400–2.
59. Lim L, Tan EC, Leung T, Manser E. The human active breakpoint cluster region-related gene encodes a brain protein with homology to guanine nucleotide exchange proteins and GTPase-activating proteins. *J Biol Chem*. 1993;268 36:27291–8.
60. Heisterkamp N, Kaartinen V, Soest SV, Bokoch G, Groffen J. Human ABR encodes a protein with GAPrac activity and homology to the DBL nucleotide exchange factor domain. *J Biol Chem* [Internet]. 1993 Aug 15 [cited 2025 Jun 24]; Available from: https://www.semanticscholar.org/paper/Human-ABR-encodes-a-protein-with-GAPrac-activity-to-Heisterkamp-Kaartinen/20b8e81419384e41a69bb6b1ba9ac3e2931ca771?utm_source=consensus
61. Chuang TH, Xu X, Kaartinen V, Heisterkamp N, Groffen J, Bokoch GM. Abr and Bcr are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. *Proc Natl Acad Sci*. 1995 Oct 24;92(22):10282–6.
62. Cho YJ, Cunnick ,Jess M., Yi ,Sun-Ju, Kaartinen ,Vesa, Groffen ,John, and Heisterkamp N. Abr and Bcr, Two Homologous Rac GTPase-Activating Proteins, Control Multiple Cellular Functions of Murine Macrophages. *Mol Cell Biol*. 2007 Feb 1;27(3):899–911.
63. Ahmed S, Lee J, Wen L, Zhao Z, Ho J, Best A, et al. Breakpoint cluster region gene product-related domain of n-chimaerin. Discrimination between Rac-binding and GTPase-activating residues by mutational analysis. *J Biol Chem* [Internet]. 1994 Jul 1 [cited 2025 Jun 24]; Available from: https://www.semanticscholar.org/paper/Breakpoint-cluster-region-gene-product-related-of-Ahmed-Lee/dd5bf2268e44d25731097bc31dde6110c1431fb5?utm_source=consensus

64. Kweon SM, Cho YJ, Minoo P, Groffen J, Heisterkamp N. Activity of the Bcr GTPase-activating Domain Is Regulated through Direct Protein/Protein Interaction with the Rho Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor * ♦. *J Biol Chem*. 2008 Feb 8;283(6):3023–30.
65. Lemmon MA. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Feb;9(2):99–111.
66. RCSB Protein Data Bank RPD. RCSB PDB - 5OC7: Crystal structure of the pleckstrin-homology domain of Bcr-Abl in complex with monobody Mb(Bcr-PH_4). [Internet]. [cited 2025 Jun 9]. Available from: <https://www.rcsb.org/structure/5OC7>
67. Nalefski EA, Falke JJ. The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity. *Protein Sci*. 1996;5(12):2375–90.
68. Rizo J, Südhof TC. C2-domains, Structure and Function of a Universal Ca²⁺-binding Domain. *J Biol Chem*. 1998 Jun 26;273(26):15879–82.
69. Nalefski EA, Wisner MA, Chen JZ, Sprang SR, Fukuda M, Mikoshiba K, et al. C2 Domains from Different Ca²⁺ Signaling Pathways Display Functional and Mechanistic Diversity. *Biochemistry*. 2001 Mar 1;40(10):3089–100.
70. Sutton RB, Davletov BA, Berghuis AM, Südhof TC, Sprang SR. Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold. *Cell* [Internet]. 1995 Mar 24 [cited 2024 Aug 3];80(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7697723/>
71. Murray D, Honig B. Electrostatic Control of the Membrane Targeting of C2 Domains. *Mol Cell*. 2002 Jan 1;9(1):145–54.
72. Sheets JW, Eulitt P, He R, Olteanu H, Coombs CC, Foster MC, et al. Philadelphia Chromosome-positive Acute Myeloid Leukemia With e1a3 BCR-ABL1 Fusion Transcript. *HemaSphere*. 2020;4(6):e484.

73. Hovorkova L, Winkowska L, Krotka J, Krumbholz M, Meyer C, Sutton R, et al. Distinct Pattern of ABL1 Genomic Breakpoints in Chronic Myeloid Leukemia and BCR::ABL1-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: Analysis of 884 Patients with Minor and Major BCR::ABL1 Fusion. *Blood*. 2023 Nov 2;142(Supplement 1):1605.
74. De Braekeleer E, Basinko A, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Berthou C, et al. Cytogenetics in pre-B and B-cell acute lymphoblastic leukemia: a study of 208 patients diagnosed between 1981 and 2008. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 Jul 1;200(1):8–15.
75. Barnes DJ, Melo JV. Cytogenetic and Molecular Genetic Aspects of Chronic Myeloid Leukaemia. *Acta Haematol*. 2002 Nov 21;108(4):180–202.
76. Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Rosti G, Soverini S, Albeer A, et al. The proportion of different BCR-ABL1 transcript types in chronic myeloid leukemia. An international overview. *Leukemia*. 2019 May;33(5):1173–83.
77. Jacobs K, Moerman A, Vandepoele K, Abeelee TV den, De Mulder K, Steel E, et al. Variant-specific BCR::ABL1 quantification discrepancy in chronic myeloid leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2024;46(5):910–7.
78. Romero-Morelos P, González-Yebra AL, Herrerías-García A, Ruíz-Velázquez FA, Bueno-Rosario LJ, González-Yebra B. Distribution of BCR::ABL1 Transcripts in the Different Clinical Phases of Chronic Myeloid Leukemia: Effect on Hematological Parameters and Patient Survival. *Genes*. 2024 May;15(5):567.
79. Molica M, Abruzzese E, Breccia M. PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF TRANSCRIPT-TYPE BCR/ABL1 IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2020 Sep 12;12(1):e2020062–e2020062.
80. Szuber N, Orazi A, Tefferi A. Chronic neutrophilic leukemia and atypical chronic myeloid leukemia: 2024 update on diagnosis, genetics, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2024;99(7):1360–87.

81. Szuber N, Tefferi A. Chronic neutrophilic leukemia: new science and new diagnostic criteria. *Blood Cancer J.* 2018 Feb 13;8(2):1–19.
82. Szuber N, Elliott M, Tefferi A. Chronic neutrophilic leukemia: 2022 update on diagnosis, genomic landscape, prognosis, and management. *Am J Hematol.* 2022;97(4):491–505.
83. Al Ghasham NS. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: A case report. *Int J Health Sci.* 2015 Jan;9(1):87–90.
84. FNBP1 - formin binding protein 1 (human) [Internet]. [cited 2025 May 13]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23048>
85. Szabo L, Morey R, Palpant NJ, Wang PL, Afari N, Jiang C, et al. Statistically based splicing detection reveals neural enrichment and tissue-specific induction of circular RNA during human fetal development. *Genome Biol.* 2015 Jun 16;16(1):126.
86. Uhlén M, Björling E, Agaton C, Szigyarto CAK, Amini B, Andersen E, et al. A Human Protein Atlas for Normal and Cancer Tissues Based on Antibody Proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2005 Dec 1;4(12):1920–32.
87. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015 Jan 23;347(6220):1260419.
88. FNBP1 protein expression summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2025 May 14]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000187239-FNBP1>
89. UniProt [Internet]. [cited 2025 May 14]. UniProt - FNBP1. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q96RU3/entry>
90. Gene: FNBP1 (ENSG00000187239) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 114 [Internet]. [cited 2025 May 14]. Available from:

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000187239;r=9:129887187-130043189

91. Ahmed S, Bu Wenyu, Lee Raphael Tze Chuen, Maurer-Stroh Sebastian, and Goh WI. F-BAR domain proteins: Families and function. *Commun Integr Biol.* 2010 Mar 1;3(2):116–21.
92. Shimada A, Niwa H, Tsujita K, Suetsugu S, Nitta K, Hanawa-Suetsugu K, et al. Curved EFC/F-BAR-Domain Dimers Are Joined End to End into a Filament for Membrane Invagination in Endocytosis. *Cell.* 2007 May 18;129(4):761–72.
93. Wang Z, Tian Z, Song X, Zhang J. Membrane tension sensing molecule-FNBP1 is a prognostic biomarker related to immune infiltration in BRCA, LUAD and STAD. *BMC Immunol.* 2022 Jan 8;23(1):1.
94. Tsujita K, Suetsugu S, Sasaki N, Furutani M, Oikawa T, Takenawa T. Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J Cell Biol.* 2006 Jan 17;172(2):269–79.
95. Serebriiskii IG, Mitina O, Pugacheva EN, Benevolenskaya E, Kotova E, Toby GG, et al. Detection of Peptides, Proteins, and Drugs That Selectively Interact With Protein Targets. *Genome Res.* 2002 Jan 11;12(11):1785–91.
96. Pichot CS, Arvanitis C, Hartig SM, Jensen SA, Bechill J, Marzouk S, et al. Cdc42-Interacting Protein 4 Promotes Breast Cancer Cell Invasion and Formation of Invadopodia through Activation of N-WASp. *Cancer Res.* 2010 Oct 31;70(21):8347–56.
97. Kurochkina N, Guha U. SH3 domains: modules of protein–protein interactions. *Biophys Rev.* 2012 Jun 20;5(1):29–39.
98. CDD Conserved Protein Domain Family: SH3 [Internet]. [cited 2025 May 14]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cl17036>

99. Kamioka Y, Fukuhara S, Sawa H, Nagashima K, Masuda M, Matsuda M, et al. A novel dynamin-associating molecule, formin-binding protein 17, induces tubular membrane invaginations and participates in endocytosis. *J Biol Chem*. 2004 Sep 17;279(38):40091–9.
100. Qian J, Chen W, Lettau M, Podda G, Zörnig M, Kabelitz D, et al. Regulation of FasL expression: A SH3 domain containing protein family involved in the lysosomal association of FasL. *Cell Signal*. 2006 Aug 1;18(8):1327–37.
101. Xiong D, Xiao S, Guo S, Lin Q, Nakatsu F, Wu M. Frequency and amplitude control of cortical oscillations by phosphoinositide waves. *Nat Chem Biol*. 2016 Mar;12(3):159–66.
102. Fuchs U, Rehkamp G f., Slany R, Follo M, Borkhardt A. The formin-binding protein 17, FBP17, binds via a TNKS binding motif to tankyrase, a protein involved in telomere maintenance. *FEBS Lett*. 2003;554(1–2):10–6.
103. Zhang J, Lin M ming, Zhang Q qing, Wang Y hong, Zhu C yang, Li X. FNBP1 was involved with the morphological control in the hepatocyte. *FASEB J*. 2011;25(S1):lb111–lb111.
104. Katoh M, Katoh M. Identification and characterization of human FNBP1L gene in silico. *Int J Mol Med*. 2004 Jan 1;13(1):157–62.
105. Zeni C, Komiya Y, Habas R. Formin Binding Protein 1 (FNBP1) regulates non-canonical Wnt signaling and vertebrate gastrulation. *Dev Biol*. 2024 Nov 1;515:18–29.
106. Saha S, Mandal A, Ranjan A, Ghosh DK. Membrane tension sensing formin-binding protein 1 is a neuronal nutrient stress-responsive Golgiphagy receptor. *Metab - Clin Exp [Internet]*. 2025 Jan 1 [cited 2025 Jun 23];162. Available from: [https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495\(24\)00268-3/abstract](https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495(24)00268-3/abstract)

107. Suman P, Mishra S, Chander H. High expression of FBP17 in invasive breast cancer cells promotes invadopodia formation. *Med Oncol*. 2018 Apr 12;35(5):71.
108. Zhang J, Li X, Zhou Y, Lin M, Zhang Q, Wang Y. FNBP1 Facilitates Cervical Cancer Cell Survival by the Constitutive Activation of FAK/PI3K/AKT/mTOR Signaling. *Cells*. 2023 Jan;12(15):1964.
109. Yoon BK, Hwang N, Chun KH, Lee Y, Duarte TPM, Kim JW, et al. Sp1-Induced FNBP1 Drives Rigorous 3D Cell Motility in EMT-Type Gastric Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan;22(13):6784.
110. Fuchs U, Rehkamp G, Haas OA, Slany R, König M, Bojesen S, et al. The human formin-binding protein 17 (FBP17) interacts with sorting nexin, SNX2, and is an MLL-fusion partner in acute myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci*. 2001 Jul 17;98(15):8756–61.
111. Miller AP, Willard HF. Chromosomal basis of X chromosome inactivation: Identification of a multigene domain in Xp11.21-p11.22 that escapes X inactivation. *Proc Natl Acad Sci*. 1998 Jul 21;95(15):8709–14.
112. Tsuchiya KD, Willard HF. Chromosomal domains and escape from X inactivation: comparative X inactivation analysis in mouse and human. *Mamm Genome*. 2000 Oct 1;11(10):849–54.
113. Brown CJ, Miller AP, Carrel L, Rupert JL, Davies KE, Willard HF. The DXS423E gene in Xp11.21 escapes X chromosome inactivation. *Hum Mol Genet*. 1995 Feb 1;4(2):251–5.
114. PubChem. SMC1A - structural maintenance of chromosomes 1A (human) [Internet]. [cited 2025 May 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8243>

115. SMC1A protein expression summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2025 May 20]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000072501-SMC1A>
116. Sarogni P, Palumbo O, Servadio A, Astigiano S, D'Alessio B, Gatti V, et al. Overexpression of the cohesin-core subunit SMC1A contributes to colorectal cancer development. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Mar 1;38(1):108.
117. Wang J, Yu S, Cui L, Wang W, Li J, Wang K, et al. Role of SMC1A overexpression as a predictor of poor prognosis in late stage colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2015 Mar 4;15(1):90.
118. Yan W, Wang DD, Zhang HD, Huang J, Hou JC, Yang SJ, et al. Expression profile and prognostic values of SMC family members in HCC. *Medicine (Baltimore).* 2022 Oct 21;101(42):e31336.
119. UniProt [Internet]. [cited 2025 May 21]. UniProt -SMC1A. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q14683/entry>
120. Davidson IF, Bauer B, Goetz D, Tang W, Wutz G, Peters JM. DNA loop extrusion by human cohesin. *Science.* 2019 Dec 13;366(6471):1338–45.
121. Wutz G, Várnai C, Nagasaka K, Cisneros DA, Stocsits RR, Tang W, et al. Topologically associating domains and chromatin loops depend on cohesin and are regulated by CTCF, WAPL, and PDS5 proteins. *EMBO J.* 2017 Dec 15;36(24):3573–99.
122. Rittenhouse NL, Downen JM. Cohesin regulation and roles in chromosome structure and function. *Curr Opin Genet Dev.* 2024 Apr 1;85:102159.
123. Nagasaka K, Davidson IF, Stocsits RR, Tang W, Wutz G, Batty P, et al. Cohesin mediates DNA loop extrusion and sister chromatid cohesion by distinct mechanisms. *Mol Cell.* 2023 Sep 7;83(17):3049-3063.e6.

124. Carico ZM, Stefan HC, Justice M, Yimit A, Downen JM. A cohesin cancer mutation reveals a role for the hinge domain in genome organization and gene expression. *PLOS Genet.* 2021 Mar 24;17(3):e1009435.
125. Di Nardo M, Astigiano S, Baldari S, Pallotta MM, Porta G, Pigozzi S, et al. The synergism of SMC1A cohesin gene silencing and bevacizumab against colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2024 Feb 16;43(1):49.
126. Zhang Y, Yi F, Wang L, Wang Z, Zhang N, Wang Z, et al. Phosphorylation of SMC1A promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration. *Int J Biol Sci.* 2018 Jun 8;14(9):1081–9.
127. Zhou J, Wu G, Tong Z, Sun J, Su J, Cao Z, et al. Prognostic relevance of SMC family gene expression in human sarcoma. *Aging.* 2020 Dec 30;13(1):1473–87.
128. Yadav S, Kowolik CM, Schmolze D, Yuan Y, Lin M, Riggs AD, et al. Association of Structural Maintenance of Chromosome-1A Phosphorylation with Progression of Breast Cancer. *Cells.* 2025 Jan;14(2):128.
129. Liu J, Feldman R, Zhang Z, Deardorff MA, Haverfield EV, Kaur M, et al. SMC1A expression and mechanism of pathogenicity in probands with X-Linked Cornelia de Lange syndrome. *Hum Mutat.* 2009;30(11):1535–42.
130. Pié J, Gil-Rodríguez MC, Ciero M, López-Viñas E, Ribate MP, Arnedo M, et al. Mutations and variants in the cohesion factor genes NIPBL, SMC1A, and SMC3 in a cohort of 30 unrelated patients with Cornelia de Lange syndrome. *Am J Med Genet A.* 2010;152A(4):924–9.
131. Kaur M, Blair J, Devkota B, Fortunato S, Clark D, Lawrence A, et al. Genomic analyses in Cornelia de Lange Syndrome and related diagnoses: Novel candidate genes, genotype–phenotype correlations and common mechanisms. *Am J Med Genet A.* 2023;191(8):2113–31.

132. Boyle M i., Jespersgaard C, Brøndum-Nielsen K, Bisgaard AM, Tümer Z. Cornelia de Lange syndrome. *Clin Genet*. 2015;88(1):1–12.
133. Kline AD, Grados M, Sponseller P, Levy HP, Blagowidow N, Schoedel C, et al. Natural history of aging in Cornelia de Lange syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2007;145C(3):248–60.
134. Kline AD, Moss JF, Selicorni A, Bisgaard AM, Deardorff MA, Gillett PM, et al. Diagnosis and management of Cornelia de Lange syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev Genet*. 2018 Oct;19(10):649–66.
135. HSPB1 heat shock protein family B (small) member 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2025 Jun 25]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=retrieve&dopt=default&rn=1&list_uids=3315
136. HSPB1 protein expression summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2025 Jun 25]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000106211-HSPB1>
137. Matsumoto T, Urushido M, Ide H, Ishihara M, Hamada-Ode K, Shimamura Y, et al. Small Heat Shock Protein Beta-1 (HSPB1) Is Upregulated and Regulates Autophagy and Apoptosis of Renal Tubular Cells in Acute Kidney Injury. *PLOS ONE*. 2015 May 11;10(5):e0126229.
138. Zhao G, Zhao L, Miao Y, Yang L, Huang L, Hu Z. HSPB1 Orchestrates the Inflammation-Associated Transcriptome Profile of Atherosclerosis in HUVECs. *Front Biosci-Landmark*. 2025 Feb 17;30(2):36306.
139. Chen K, Hou C, Xu L, Peng H, He C, Liu J, et al. HSPB1 Regulates Autophagy and Apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cells in Arteriosclerosis Obliterans. *Cardiovasc Ther*. 2022;2022(1):3889419.

140. Racigh V, Sawicki LR, Bravo FNE, Fornasari MS. Coevolution in human small Heat Shock Protein 1 is promoted by interactions between the Alpha-Crystallin domain and the disordered regions. *PLOS ONE*. 2025 May 5;20(5):e0321163.
141. Baranova EV, Weeks SD, Beelen S, Bukach OV, Gusev NB, Strelkov SV. Three-Dimensional Structure of α -Crystallin Domain Dimers of Human Small Heat Shock Proteins HSPB1 and HSPB6. *J Mol Biol*. 2011 Aug 5;411(1):110–22.
142. Afzal U, Bukhari S, Pervez MT, Aslam N. Computational Analysis of Heat shock Protein 27 (HSP27) from different source organisms. *VFAST Trans Softw Eng*. 2022 Feb 7;10(1):1–16.
143. Berkeley RF, Plonski AP, Phan TM, Grohe K, Becker L, Wegner S, et al. Capturing the Conformational Heterogeneity of HSPB1 Chaperone Oligomers at Atomic Resolution. *J Am Chem Soc*. 2025 May 7;147(18):15181–94.
144. Clouser AF, Baughman HE, Basanta B, Guttman M, Nath A, Klevit RE. Interplay of disordered and ordered regions of a human small heat shock protein yields an ensemble of ‘quasi-ordered’ states. Neuweiler H, Wolberger C, Neuweiler H, Jaudzems K, editors. *eLife*. 2019 Oct 1;8:e50259.
145. Baughman HER, Pham THT, Adams CS, Nath A, Klevit RE. Release of a disordered domain enhances HspB1 chaperone activity toward tau. *Proc Natl Acad Sci*. 2020 Feb 11;117(6):2923–9.
146. Arrigo AP. Mammalian HspB1 (Hsp27) is a molecular sensor linked to the physiology and environment of the cell. *Cell Stress Chaperones*. 2017 Jul 1;22(4):517–29.
147. Bruey JM, Paul C, Fromentin A, Hilpert S, Arrigo AP, Solary E, et al. Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Oncogene*. 2000 Oct;19(42):4855–63.

148. He J, Hou X, Wu J, Wang K, Qi X, Wei Z, et al. Hspb1 protects against severe acute pancreatitis by attenuating apoptosis and ferroptosis via interacting with Anxa2 to restore the antioxidative activity of Prdx1. *Int J Biol Sci*. 2024 Feb 25;20(5):1707–28.
149. Long S, Peng F, Song B, Wang L, Chen J, Shang B. Heat Shock Protein Beta 1 is a Prognostic Biomarker and Correlated with Immune Infiltrates in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Gen Med*. 2021 Sep 10;14:5483–92.
150. Fu Q, Li Y, Shi C. HSPB1 as an RNA-binding protein mediates the pathological process of osteoarthritis. *J Orthop Surg*. 2024 Mar 1;19(1):156.
151. Zhang Y, Li B, Li C, Zhao S, Chen Y. Analysis of the Prognostic and Immunological Role of HSPB1 in Pituitary Adenoma: A Potential Target for Therapy. *Medicina (Mex)* [Internet]. 2023 [cited 2025 Jun 25];59. Available from: <https://consensus.app/papers/analysis-of-the-prognostic-and-immunological-role-of-hspb1-zhang-li/727450181ff5503a9598af08d85b89eb/>
152. Seigneuric R, Mjahed H, Gobbo J, Joly AL, Berthenet K, Shirley S, et al. Heat Shock Proteins as Danger Signals for Cancer Detection. *Front Oncol* [Internet]. 2011 Nov 10 [cited 2025 May 15];1. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2011.00037/full>
153. Jalkanen SE, Lahesmaa-Korpinen AM, Heckman CA, Rantanen V, Porkka K, Hautaniemi S, et al. Phosphoprotein profiling predicts response to tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukemia patients. *Exp Hematol*. 2012 Sep 1;40(9):705-714.e3.
154. Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S, Charpentier E. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*. 2018 Mar 8;172(6):1239–59.
155. Jackson SA, McKenzie RE, Fagerlund RD, Kieper SN, Fineran PC, Brouns SJJ. CRISPR-Cas: Adapting to change. *Science*. 2017 Apr 7;356(6333):eaal5056.

156. Jiang F, Doudna JA. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys.* 2017 May 22;46(Volume 46, 2017):505–29.
157. Bhatia S, Pooja, Yadav SK. CRISPR-Cas for genome editing: Classification, mechanism, designing and applications. *Int J Biol Macromol.* 2023 May 31;238:124054.
158. Wang M, Zhang R, Li J. CRISPR/cas systems redefine nucleic acid detection: Principles and methods. *Biosens Bioelectron.* 2020 Oct 1;165:112430.
159. Knott GJ, Doudna JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science.* 2018 Aug 31;361(6405):866–9.
160. Pickar-Oliver A, Gersbach CA. The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Aug;20(8):490–507.
161. Liu G, Lin Q, Jin S, Gao C. The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies. *Mol Cell.* 2022 Jan 20;82(2):333–47.
162. Zhang B. CRISPR/Cas gene therapy. *J Cell Physiol.* 2021;236(4):2459–81.
163. Liu Y, Zhao G, Xu CF, Luo YL, Lu ZD, Wang J. Systemic delivery of CRISPR/Cas9 with PEG-PLGA nanoparticles for chronic myeloid leukemia targeted therapy. *Biomater Sci.* 2018 May 29;6(6):1592–603.
164. Tan YT, Ye L, Xie F, Wang J, Müschen M, Chen SJ, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene deletion efficiently retards the progression of Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia in a p210 BCR-ABL1T315I mutation mouse model. *Haematologica.* 2020 May 1;105(5):e232–6.
165. García-Tuñón I, Hernández-Sánchez M, Ordoñez JL, Alonso-Pérez V, Álamo-Quijada M, Benito R, et al. The CRISPR/Cas9 system efficiently reverts the tumorigenic ability of BCR/ABL in vitro and in a xenograft model of chronic myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2017 Feb 9;8(16):26027–40.

166. Vuelta E, Ordoñez JL, Alonso-Pérez V, Méndez L, Hernández-Carabias P, Saldaña R, et al. CRISPR/Cas9 technology abolishes the BCR/ABL1 oncogene in chronic myeloid leukemia and restores normal hematopoiesis [Internet]. bioRxiv; 2020 [cited 2025 Jun 19]. p. 2020.08.05.237610. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.08.05.237610v2>
167. Taylor MJ, Perrais D, Merrifield CJ. A High Precision Survey of the Molecular Dynamics of Mammalian Clathrin-Mediated Endocytosis. *PLOS Biol.* 2011 Mar 22;9(3):e1000604.
168. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov 24;7(6):1513–23.
169. Sambrook J, Russell DW. Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Midiprep. Sambrook J, Russell D, editors. *Cold Spring Harb Protoc.* 2006 Jun;2006(1):pdb.prot3901.
170. Lezin G, Kosaka Y, Yost HJ, Kuehn MR, Brunelli L. A One-Step Miniprep for the Isolation of Plasmid DNA and Lambda Phage Particles. *PLOS ONE.* 2011 Aug 15;6(8):e23457.
171. Sauer ML, Kollars B, Geraets R, Sutton F. Sequential CaCl₂, polyethylene glycol precipitation for RNase-free plasmid DNA isolation. *Anal Biochem.* 2008 Sep 15;380(2):310–4.
172. Li MZ, Elledge SJ. SLIC: a method for sequence- and ligation-independent cloning. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2012;852:51–9.
173. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug;227(5259):680–5.
174. Yokom A. GST Bead pulldown Assay. 2022 Jul 8 [cited 2025 Jun 18]; Available from: <https://www.protocols.io/view/gst-bead-pulldown-assay-ccwksxcw>

175. Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee YH, Goto Y, Réfrégiers M, et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci*. 2015 Jun 16;112(24):E3095–103.
176. Micsonai A, Wien F, Bulyáki É, Kun J, Moussong É, Lee YH, et al. BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jul 2;46(W1):W315–22.
177. Micsonai A, Bulyáki É, Kardos J. BeStSel: From Secondary Structure Analysis to Protein Fold Prediction by Circular Dichroism Spectroscopy. In: Chen YW, Yiu CPB, editors. *Structural Genomics: General Applications* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2021 [cited 2024 May 16]. p. 175–89. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0892-0_11
178. Micsonai A, Moussong É, Murvai N, Tantos Á, Tóke O, Réfrégiers M, et al. Disordered–Ordered Protein Binary Classification by Circular Dichroism Spectroscopy. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2022 May 3 [cited 2025 Feb 4];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-biosciences/articles/10.3389/fmolb.2022.863141/full>
179. Micsonai A, Moussong É, Wien F, Boros E, Vadászi H, Murvai N, et al. BeStSel: webserver for secondary structure and fold prediction for protein CD spectroscopy. *Nucleic Acids Res*. 2022 Jul 5;50(W1):W90–8.
180. Jones DT. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices1. *J Mol Biol*. 1999 Sep 17;292(2):195–202.
181. Buchan DWA, Jones DT. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jul 2;47(W1):W402–7.
182. Moffat L, Jones DT. Increasing the accuracy of single sequence prediction methods using a deep semi-supervised learning framework. *Bioinformatics*. 2021 Nov 5;37(21):3744–51.

183. Kandathil SM, Greener JG, Lau AM, Jones DT. Ultrafast end-to-end protein structure prediction enables high-throughput exploration of uncharacterized proteins. *Proc Natl Acad Sci*. 2022 Jan 25;119(4):e2113348119.
184. Hornbeck PV, Chabra I, Kornhauser JM, Skrzypek E, Zhang B. PhosphoSite: A bioinformatics resource dedicated to physiological protein phosphorylation. *PROTEOMICS*. 2004;4(6):1551–61.
185. PhosphoSitePlus [Internet]. [cited 2025 Jun 17]. Available from: <https://www.phosphosite.org/homeAction>
186. Dinkel H, Chica C, Via A, Gould CM, Jensen LJ, Gibson TJ, et al. Phospho.ELM: a database of phosphorylation sites—update 2011. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jan 1;39(suppl_1):D261–7.
187. Phospho.ELM Result [Internet]. [cited 2025 Jun 22]. Available from: <http://phospho.elm.eu.org/>
188. Chen M, Zhang W, Gou Y, Xu D, Wei Y, Liu D, et al. GPS 6.0: an updated server for prediction of kinase-specific phosphorylation sites in proteins. *Nucleic Acids Res*. 2023 Jul 5;51(W1):W243–50.
189. GPS 6.0 - Kinase-specific Phosphorylation Site Prediction [Internet]. [cited 2025 Jun 17]. Available from: <https://gps.biocuckoo.cn/online.php>
190. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*. 2021 Feb 1;10(2):giab008.
191. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010 Mar 1;26(5):589–95.
192. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009 Jul 15;25(14):1754–60.

193. Chen K, Wallis JW, McLellan MD, Larson DE, Kalicki JM, Pohl CS, et al. BreakDancer: an algorithm for high-resolution mapping of genomic structural variation. *Nat Methods*. 2009 Sep;6(9):677–81.
194. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*. 2011 Jan;29(1):24–6.
195. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Wenger AM, Zehir A, Mesirov JP. Variant Review with the Integrative Genomics Viewer. *Cancer Res*. 2017 Oct 31;77(21):e31–4.
196. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*. 2013 Mar 1;14(2):178–92.
197. Larsen AH, Sansom MSP. Binding of Ca²⁺-independent C2 domains to lipid membranes: A multi-scale molecular dynamics study. *Structure*. 2021 Oct 7;29(10):1200-1213.e2.
198. Corbalan-Garcia S, Gómez-Fernández JC. Signaling through C2 domains: More than one lipid target. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 2014 Jun 1;1838(6):1536–47.
199. Ernst O, Zor T. Linearization of the Bradford Protein Assay. *J Vis Exp*. 2010 Apr 12;(38):e1918.
200. CATH Superfamily 2.60.40.150 [Internet]. [cited 2025 Jun 17]. Available from: <https://www.cathdb.info/version/latest/superfamily/2.60.40.150/classification>
201. Bass TE, Fleenor DE, Burrell PE, Kastan MB. ATM Regulation of the Cohesin Complex Is Required for Repression of DNA Replication and Transcription in the Vicinity of DNA Double-Strand Breaks. *Mol Cancer Res*. 2023 Mar 1;21(3):261–73.

202. Hayes D, Napoli V, Mazurkie A, Stafford WF, Graceffa P. Phosphorylation Dependence of Hsp27 Multimeric Size and Molecular Chaperone Function *. *J Biol Chem*. 2009 Jul 10;284(28):18801–7.
203. Kostenko S, Moens U. Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Oct 1;66(20):3289–307.
204. Bohdanowicz M, Grinstein S. Role of Phospholipids in Endocytosis, Phagocytosis, and Macropinocytosis. *Physiol Rev*. 2013 Jan;93(1):69–106.
205. Marat AL, Haucke V. Phosphatidylinositol 3-phosphates—at the interface between cell signalling and membrane traffic. *EMBO J*. 2016 Mar 15;35(6):561–79.
206. Posor Y, Jang W, Haucke V. Phosphoinositides as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022 Dec;23(12):797–816.
207. Yang Y, Lee M, Fairn GD. Phospholipid subcellular localization and dynamics. *J Biol Chem*. 2018 Apr 27;293(17):6230–40.
208. Lennartz MR. Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999 Mar 1;31(3):415–30.
209. Tony Yeung, Yeung T, Gary E. Gilbert, Gilbert GE, Jialan Shi, Shi J, et al. Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science*. 2008 Jan 11;319(5860):210–3.
210. Hasegawa J, Uchida Y, Mukai K, Lee S, Matsudaira T, Taguchi T. A Role of Phosphatidylserine in the Function of Recycling Endosomes. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2021 Dec 24 [cited 2024 Sep 24];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2021.783857/full>

211. Minakami R, Maehara Y, Kamakura S, Kumano O, Miyano K, Sumimoto H. Membrane phospholipid metabolism during phagocytosis in human neutrophils. *Genes Cells*. 2010;15(5):409–24.
212. Scott CC, Dobson W, Botelho RJ, Coady-Osberg N, Chavrier P, Knecht DA, et al. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis. *J Cell Biol*. 2005 Apr 4;169(1):139–49.
213. Coppolino MG, Dierckman R, Loijens J, Collins RF, Pouladi M, Jongstra-Bilen J, et al. Inhibition of Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase I α Impairs Localized Actin Remodeling and Suppresses Phagocytosis *. *J Biol Chem*. 2002 Nov 15;277(46):43849–57.

ДОДАТОК А

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.
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.
3. Antonenko SV, Gurianov DS, **Kravchuk IV**, Dybkov MV, Shvachko LP, Telegeev GD. Role of BCR and FBNP1 Proteins in Phagocytosis as a Model of Membrane Rearrangements with Chronic Myelogenous Leukemia. *Cytol Genet*. 2023 Aug 1;57(4):291–7.
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.
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.
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 лейкозів. Вісник невідкладної та відновної медицини. 2012;13(1):76–8.
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.
 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 лейкозів. In: Актуальні питання гематології та трансфузіології. Київ; 2011. р. 143–4.
 9. Тютюнникова АП, **Кравчук ІВ**, Малюта ОВ, Дибков МВ, Малюта СС, Телегеев ГД. Роль Bcr та асоційованих із ним білків у розвитку мієлопроліферативних захворювань. Фактори Експериментальної Еволюції Організмів. 2011;11:536–40.
 10. Малюта ОВ, **Кравчук ІВ**, Тютюнникова АП, Лисецька ТЮ, Дибков МВ, Телегеев ГД. Структурно-функціональна роль доменів РН і С2 білка Bcr/Abl в розвитку Ph-позитивних лейкозів. In: Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології. Київ; 2010. р. 115–6.
 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 лейкозах з t(9;22). In: Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені ПЛ Шупика. Київ; р. 203–13.
 12. Zimina OV, **Kravchuk IV**, Telegeev GD. DNA editing of Bcr/Abl hybrid gene in K562. In: Abstract Book: BASEL LIFE. 2018. р. 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, Miroshnychenko 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. Dubrovskaya 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, Телегеев ГД. Роль РН домена білка Vcr/Abl у розвитку ХМЛ. In: *Фундаментальні та прикладні дослідження в біології*. Донецьк; 2009. p. 139.