

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Кваліфікаційна робота
освітній ступінь – магістр

на тему: «**ЗАЛУЧЕННЯ БІЛКА FBP17 У КЛІТИННІ ПРОЦЕСИ,
АСОЦІЙОВАНІ З ГІБРИДНИМ БІЛКОМ VSR/ABL**»

Виконала: студентка 2-го року навчання,
спеціальності 091 Біологія та біохімія
Сікорська Таїсія Ігорівна

Керівники:

Гур'янов Д.С., к.б.н.,
наук. співробітник відділу молекулярної
генетики
Інституту молекулярної біології і
генетики НАНУ

Руссу І.З., к.б.н., доцент кафедри
лабораторної діагностики біологічних
систем НаУКМА

Рецензент: Папуга Олександр
Євгенійович, к.б.н., наук. співробітник
відділу генетики людини Інституту
молекулярної біології і генетики НАНУ

Кваліфікаційна робота захищена
з оцінкою _____

Секретар ЕК _____

«__» липня 2025 року

Київ – 2025

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1	7
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Формування BCR-химерних білків внаслідок хромосомних транслокацій та їх значення в онкогенезі на прикладі хронічної мієлоїдної лейкемії	7
1.1.1. Роль хромосомних транлокацій у розвитку хронічної мієлоїдної лейкемії.	7
1.1.2. Хромосомні транслокації у формуванні химерних білків BCR в онкогенезі.....	10
1.2. Структурна організація та функціональна активність білків BCR, ABL1 та химерного білка BCR-ABL1	12
1.2.1. Структурно-функціональна характеристика химерного білка BCR- ABL.....	12
1.2.2. Характеристика кінази ABL1.	17
1.2.3. Молекулярна будова та функціональна активність білка BCR.	18
1.4. Вплив DN–PN доменів на клітинну локалізацію та сигнальні взаємодії BCR-ABL.	20
1.5. Характеристика білка FBP17	24
РОЗДІЛ 2	27
ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	27
2.1. Опис об'єкта і предмета дослідження	27
2.2. Реактиви, розчини, середовища та обладнання, що були використані в роботі	28
2.2.2. Розчини.	29
2.2.3. Живильні середовища.	30
2.2.4. Вектори, плазмідни та біологічний матеріал.	31
2.2.5. Ферменти.	31
2.2.6. Антитіла.	31
2.2.7. Обладнання та витратні матеріали.....	31

2.3. Методи дослідження.....	32
2.3.1. Приготування компетентних клітин <i>E. coli</i>	32
2.3.2. Трансформація компетентних клітин методом теплового шоку.	33
2.3.3. Створення генетичної конструкції pGEX4T1-FBP17.....	33
2.3.3.1. Отримання плазмідної ДНК з клітин <i>E. Coli</i> методом лужного лізису.	33
2.3.3.2. Очищення плазмід.	34
2.3.3.3. Ферментативна обробка плазмідної ДНК.	34
2.3.3.4. Електрофоретичне розділення та очищення фрагментів ДНК після рестрикції.	35
2.3.3.5. Лігування.	36
2.3.4. Експресія та очищення рекомбінантних білків.	36
2.3.4.1. Денатуруючий електрофорез в поліакриламідному гелі.	38
2.3.5. GST-пулдаун.....	39
2.3.6. Вестерн блот аналіз.....	39
2.3.6.1. Проведення електрофорезу та перенесення білків на мембрану. .	39
2.3.6.2. Блокування мембрани та імунодетекція.....	40
РОЗДІЛ 3	41
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	41
3.1. Створення генетичної конструкції pGEX4T1-FBP17.....	41
3.2. Оцінка експресії рекомбінантного білка GST-FBP17 методом SDS-PAGE	43
3.3. Перевірка взаємодії домену PH білка BCR з GST-FBP17 методом GST-пулдауну за допомогою SDS-PAGE.....	44
3.4. Візуалізація взаємодії білків PH-домену BCR та FBP17 методом вестерн-блот.....	46
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	48
ВИСНОВКИ.....	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	51

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

Abl – лейкемія Абельсона (Abelson leukemia)

Arp2/3 – актин-споріднений білок (actin-related protein)

Bcr – ділянка сайтів розриву (breakpoint cluster region)

CC – згорнуте кільце (coiled coil)

PH – гомолог плекстрину (pleckstrin homology)

RhoGAP – білок-активатор Rho-подібних малих ГТФаз (Rho GTPase-activator protein)

RhoGAP_Bcr – BCR-споріднений білок активатор Rho-подібних малих ГТФаз (BCR-related Rho GTPase-activator protein)

RhoGDI α – інгібітор від'єднання гуаніну α білка Rho (Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor α)

RhoGEF – фактор обміну гуаніну для Rho/Rac/Cdc42-подібних ГТФаз (Rho/Rac/Cdc42 Guanine nucleotide exchange factor)

GST – глутатіон-S-трансфераза (glutathione-S-transferase)

NES – сигнал ядерного експорту (nuclear exporting signal)

NF- κ B – ядерний фактор каппа-B (nuclear factor kappa-B)

NSL – сигнал ядерної локалізації (nuclear localization signal)

F-актин – полімерний (filamentous) актин

ВСТУП

Злоякісна трансформація клітин є складним багатоступеневим процесом, що ґрунтується на накопиченні генетичних змін, серед яких — мутації, активація онкогенів та інактивація генів-супресорів пухлинного росту. Однією з найважливіших категорій таких змін є хромосомні транслокації, які зумовлюють утворення функціонально активних химерних білків із онкогенними властивостями. Протягом останніх десятиліть було встановлено, що близько 20% усіх злоякісних новоутворень пов'язані з такими транслокаціями [1].

Серед відомих онкогенних злиттів найбільш дослідженим є химерний тирозинкіназний білок BCR-ABL, що утворюється внаслідок транслокації $t(9;22)(q34;q11)$, яка отримала назву Філадельфійська хромосома. Ця генетична перебудова виявляється у 95% випадків хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ) і є маркером Ph⁺-лейкемії [2]. Злитий білок BCR-ABL є конститутивно активною тирозинкіназою, здатною запускати широкий спектр сигнальних каскадів, що стимулюють проліферацію, пригнічують апоптоз, змінюють диференціювання, адгезію та цитоскелетну організацію клітини [2, 3].

Існують дві основні ізоформи BCR-ABL — p190 та p210, що відрізняються за розміром та доменною організацією. Ізоформа p210 містить унікальну ділянку з 501 амінокислоти, з гена BCR, яка включає домени DH (Dbl Homology) та PH (Pleckstrin Homology), що надають білку додаткових функціональних властивостей [4]. PH-домен BCR-ABL, здатен взаємодіяти з низкою клітинних білків, зокрема, таких, що беруть участь у міжклітинній сигналізації, метаболізмі та везикулярному транспорті [5]. Таким чином, білок-білкові взаємодії постають як ключовий механізм реалізації патологічної дії химерного онкогенного білка, забезпечуючи формування багатфункціональних сигнальних платформ у цитоплазмі. Ці взаємодії є

основою для інтеграції клітинних сигналів і регуляції процесів, пов'язаних із виживанням, ростом та трансформацією клітин. [6].

У цьому контексті особливу увагу привертає білок Formin Binding Protein 17 (FBP17) — адаптерний білок, що бере участь у регуляції актинового цитоскелету, формуванні інвадоподій, ендоцитозі та клітинній міграції [7]. FBP17 локалізується переважно у цитоплазмі та характеризується підвищеним рівнем в інвазивних клітинах злоякісних пухлин, де сприяє формуванню структур, залучених до проникнення клітин через базальні мембрани, зокрема, інвадоподій [8]. У гемопоетичних тканинах FBP17 виявляється переважно під час еритропоезу, що свідчить про його потенційну участь у регуляції процесів дозрівання кровотворних клітин [4]. Залучення FBP17 до білок-білкових взаємодій, опосередкованих BCR-ABL, є перспективним напрямом досліджень, що дозволяє глибше зрозуміти механізми злоякісної трансформації та клітинної інвазії. Ймовірність фізичної або функціональної взаємодії між BCR-ABL та FBP17, з огляду на їхню цитоплазматичну локалізацію та участь у подібних сигнальних і структурних каскадах, відкриває нові підходи до вивчення патогенезу Ph⁺-лейкемій і пошуку нових мішеней терапії.

З огляду на вищевикладене, метою даної роботи було визначення наявності або відсутності взаємодії між PH-доменом білка BCR та білком FBP17. Відповідно до мети було сформовано такі завдання:

1. Отримати конструкцію для бактеріальної експресії гена *FBP17*.
2. Напрацювати та очистити рекомбінантні білки FBP17 та PH-домен білка BCR.
3. Провести GST-пулдаун для перевірки взаємодії між PH-доменом білка BCR та білком FBP17.
4. Провести вестерн-блотинг для візуалізації зв'язку між білками.

Експериментальну частину роботи виконано на базі Інституту молекулярної біології та генетики НАН України в лабораторії відділу молекулярної генетики під керівництвом Гур'янова Дмитра Сергійовича.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Формування BCR-химерних білків внаслідок хромосомних транслокацій та їх значення в онкогенезі на прикладі хронічної мієлоїдної лейкемії

1.1.1. Роль хромосомних транслокацій у розвитку хронічної мієлоїдної лейкемії.

Хромосомні транслокації є одним із ключових механізмів геномної нестабільності, що відіграють визначальну роль у розвитку різних злоякісних новоутворень, зокрема, хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ) [1]. Транслокація — це структурна перебудова хромосом, при якій відбувається переміщення або обмін ділянками між негомологічними хромосомами. У результаті таких змін можуть зливатися гени, які в нормі розташовані на різних хромосомах, що призводить до утворення химерних генів із новими, патологічними функціями. За механізмом утворення транслокації поділяються на реципрокні (взаємний обмін сегментами між двома хромосомами) та нерципрокні (переміщення ділянки з однієї хромосоми на іншу без зворотного обміну) (рис 1.1). Крім того, транслокації класифікують як збалансовані — коли генетичний матеріал не втрачається і не набувається, та незбалансовані, що супроводжуються делецією (втратою) або дуплікацією (подвоєнням) геномного матеріалу [9].

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) є клональним мієлопроліферативним захворюванням, що виникає внаслідок хромосомної транслокації $t(9;22)(q34;q11)$, яка створює так звану Філадельфійську (Ph) хромосому (рис 1.2) — злиття генів *BCR* та *ABL* [10]. Цей фузійний ген кодує тирозинкіназу BCR-ABL із конститутивною активністю, яка ініціює неконтрольовану проліферацію гемопоетичних клітин [10,4]. У 95% випадків ХМЛ виявляють наявність саме Ph-хромосоми [8, 10 5].

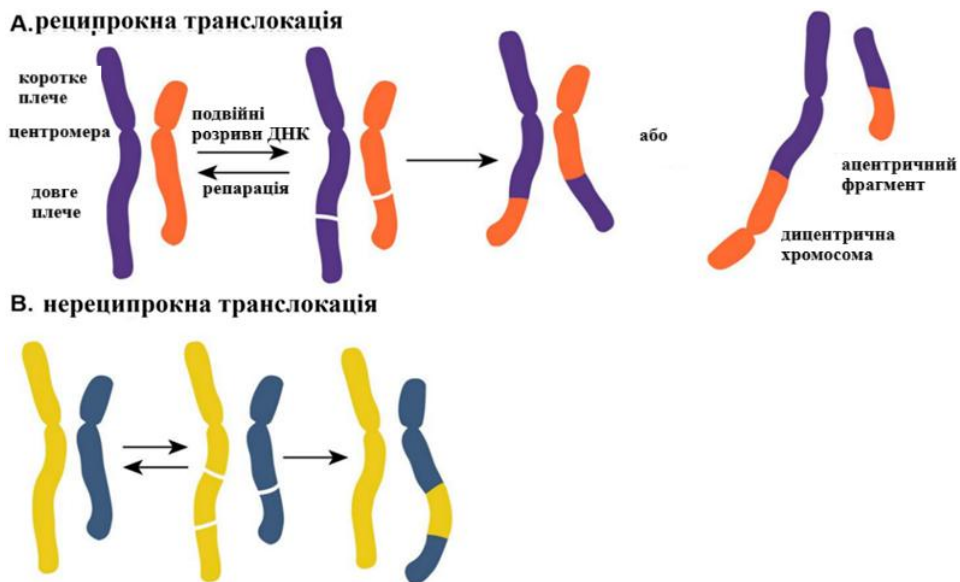


Рис 1.1 Типи хромосомних транслокацій. Неправильне з'єднання двох дволанцюгових розривів ДНК у негомологічних хромосомах може призвести до: (А) реципрокної транслокації — у разі двостороннього обміну ділянками, або (В) нереципрокної транслокації — при односпрямованому перенесенні фрагмента між хромосомами. Адаптовано з [9].

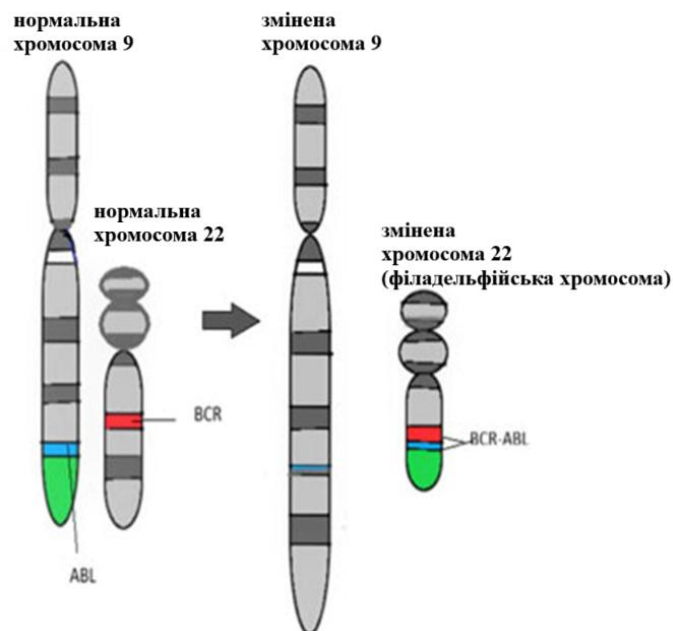


Рис 1.2 Схематична діаграма нормальної структури хромосом 9 та 22 та транслокації між хромосомами 9 та 22, що призводить до утворення Філадельфійської хромосоми. Адаптовано з [11].

Існують три основні варіанти точок розриву гена *BCR*: M-BCR, m-BCR та μ -BCR, (рис 1.3) які визначають тип транскрипту злиття та розмір кінцевого білка (стаття 2, 5). У ХМЛ переважають транскрипти *e13a2* (b2a2) та *e14a2* (b3a2), які кодують ізоформу білка p210 BCR-ABL [12].

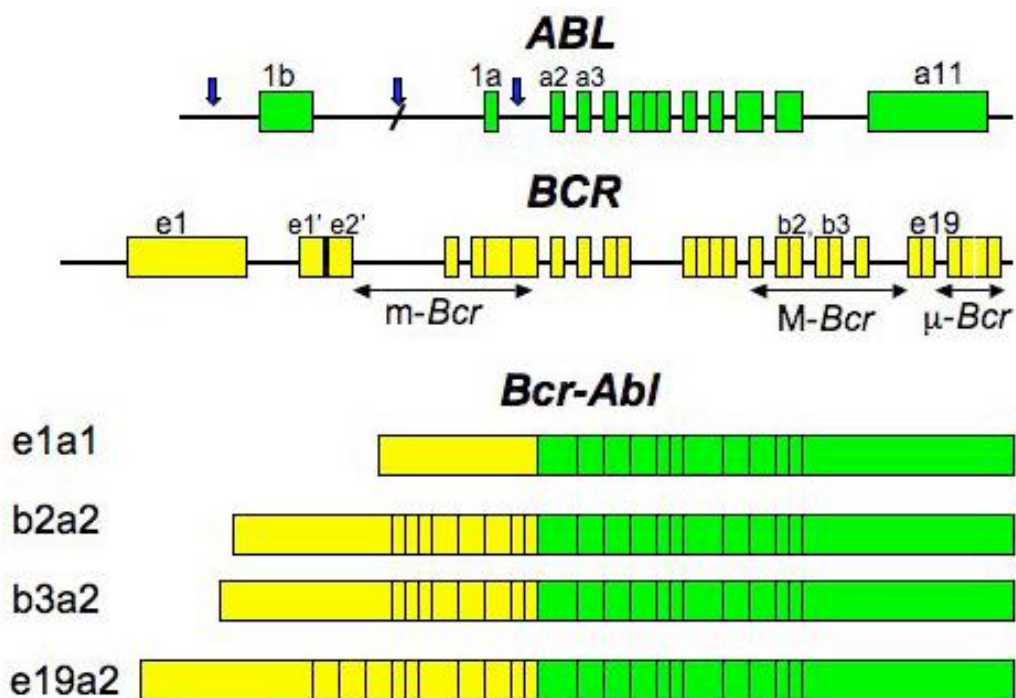


Рис 1.3 Схема положення точок розриву в генах *BCR* та *ABL* і структура химерних мРНК, що утворюються внаслідок транслокації t(9;22)(q34;q11). Зображено екзонно-інтронну організацію генів *ABL* (зелений) та *BCR* (жовтий), а також основні зони розриву: m-BCR, M-BCR і μ -BCR. У нижній частині наведено варіанти злитих транскриптів BCR-ABL: e1a1, b2a2, b3a2 та e19a2, які відповідають утворенню онкобілків p190, p210 та p230, асоційованих із різними формами лейкемії. Адаптовано [15].

Інші варіанти, як-от *e1a2* (p190) або *e19a2* (p230), частіше зустрічаються при гострих лейкеміях або атипових формах ХМЛ [12,13]. Протеомні дослідження показали, що p190 та p210 активують різні внутрішньоклітинні сигнальні мережі, що може впливати на патогенез і чутливість до терапії [8]. Молекулярна природа транслокації полягає у виникненні дволанцюгових

розривів ДНК у двох негомологічних хромосомах. Причинами цього можуть бути вплив іонізуючого випромінювання, активних форм кисню, порушення функції ферментів (ДНК-топоізомераза II, комплекс RAG), або патологічна V(D)J-рекомбінація [8,14].

Варто також зазначити, що в окремих випадках ХМЛ не виявляється Ph-хромосома на каріотипі, проте в таких пацієнтів при молекулярному аналізі можна виявити прихований ген *BCR-ABL* — "Ph-негативний, BCR-ABL-позитивний" ХМЛ [11]. Таким чином, транслокація t(9;22) та утворення гена злиття *BCR-ABL* є ключовим патогенетичним механізмом розвитку ХМЛ.

1.1.2. Хромосомні транслокації у формуванні химерних білків BCR в онкогенезі.

Як зазначалося раніше, ген *BCR* є ключовим учасником хромосомних транслокацій, найвідомішою з яких є транслокація t(9;22)(q34;q11) із утворенням химерного онкогена *BCR::ABL1*, що лежить в основі патогенезу хронічної мієлоїдної лейкемії. Однак *BCR* є також партнером злиття з іншими тирозинкіназами, такими як *FGFR1*, *PDGFRA*, *RET*, *JAK2* [2]. Такі злиття виявляють при широкому спектрі гематологічних злоякісних новоутворень, включаючи гостру мієлоїдну лейкемію, атипову ХМЛ, стовбурово-клітинну лейкемію та лімфоми. Злиття *BCR::FGFR1* (Рис. 1.4), що виникає внаслідок транслокації t(8;22)(p11;q11), характерне для мієлопроліферативного синдрому із залученням *FGFR1*, який клінічно може проявлятися у вигляді стовбурово-клітинної лейкемії, гострої мієлоїдної лейкемії (ГМЛ), атипової ХМЛ (аХМЛ) та лімфоїдних неоплазій. У химерному білку зберігається олігомеризаційний домен *BCR*, що забезпечує автокаталітичну активацію кінази *FGFR1* на С-кінці білка [2,16].

Інший варіант це — *BCR::PDGFRA*, що формується при транслокації t(4;22)(q12;q11) [2,17]. Це злиття було виявлено при атиповій ХМЛ, мієлопроліферативних новоутвореннях, а також Т-клітинній лімфобластній лейкемії (рис 1.4).

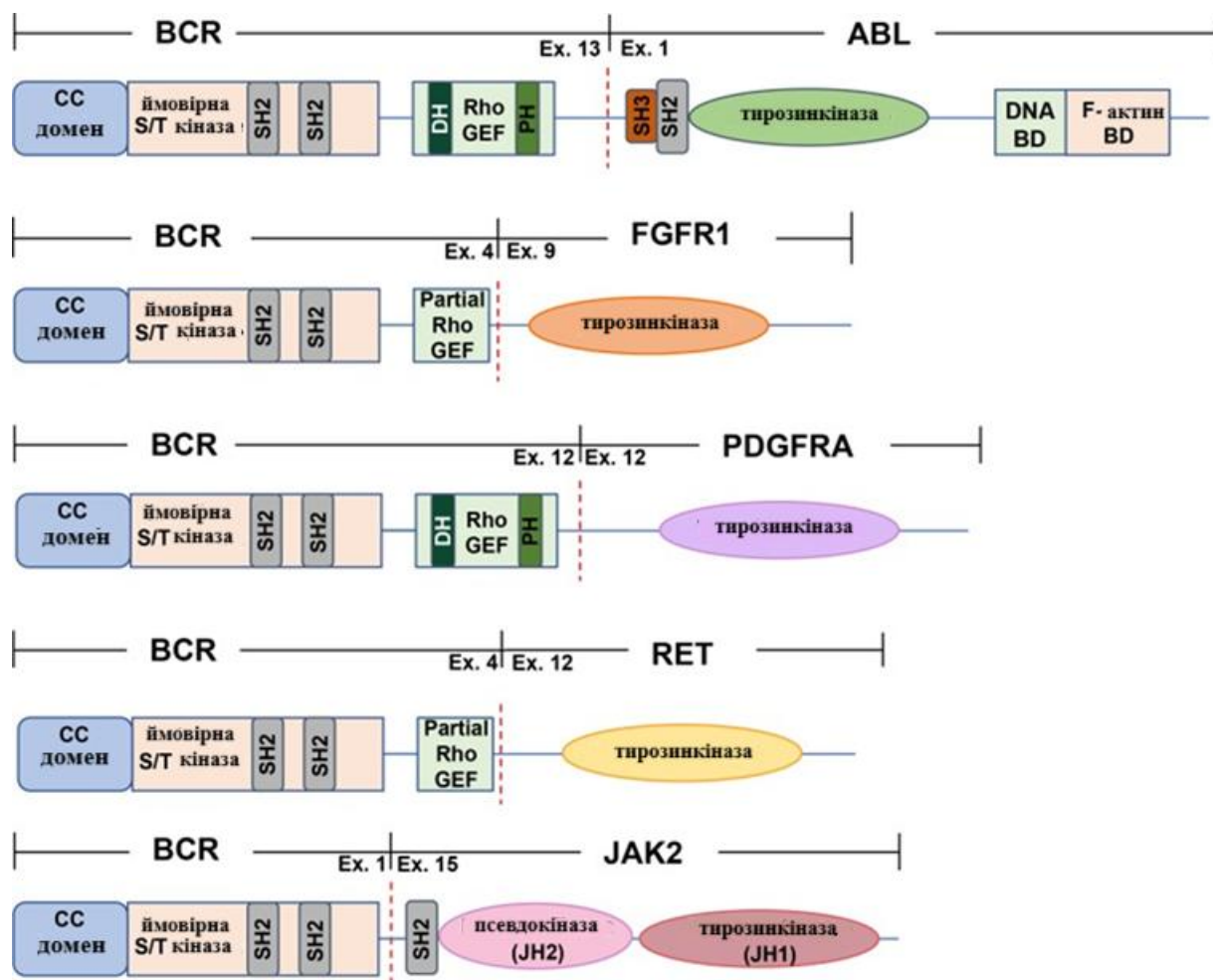


Рис 1.4. Схематичне зображення найпоширеніших варіантів злитих онкобілків за участю гена *BCR*. Зображено структуру злитих білків, які утворюються внаслідок хромосомних транслокацій між геном *BCR* та різними тирозинкіназними генами-партнерами: *ABL*, *FGFR1*, *PDGFRA*, *RET* та *JAK2*. Пунктирні вертикальні лінії вказують на точки розриву (breakpoints) в обох генах. Номери екзонів над лініями вказують, які саме частини генів беруть участь у злитті. Адаптовано з [2].

У таких випадках спостерігається злиття одного з кількох екзонів гена *BCR* (найчастіше 7, 12 або 17) з екзоном 12 *PDGFRA*, що кодує тирозинкіназний домен. Як наслідок, формується функціонально активний онкогенний білок, який зберігає N-кінцевий домен *BCR* та C-кінцеву активну кіназу *PDGFRA* [17,18]. Злиття *BCR* з *RET* (**RE**arranged during **T**ransfection) спостерігається при окремих формах мієлопроліферативних новоутворень і

гострої лейкемії [2]. RET є рецепторною тирозинкіназою, і після злиття з BCR кіназна активність цього рецептора стає постійно активованою завдяки олігомеризаційній здатності BCR [19]. Транслокація типово виглядає як $t(10;22)(q11;q11)$ [2]. (рис. 1.4) Іншим рідкісним, але функціонально значущим злиттям є $BCR::JAK2$, що виникає в результаті транслокації $t(9;22)(p24;q11)$ [20]. Це злиття було виявлено у пацієнтів із мієлопроліферативними та мієлодиспластичними синдромами, а також у деяких випадках гострої лейкемії [2, 20]. JAK2— цитоплазматична тирозинкіназа, яка бере участь у сигнальних шляхах від цитокінових рецепторів. У химерному білку $BCR::JAK2$ зберігається N-кінцевий домен BCR, який відповідає за олігомеризацію, що призводить до постійної активації JAK2 і патологічного клітинного росту [2,21].

Причиною частого залучення *BCR* до транслокацій вважається його розташування поблизу крихких сайтів хромосом, що є геномними регіонами з підвищеною схильністю до розривів під впливом реплікаційного стресу [2,22]. За даними низки досліджень, до 64% точок розриву при хромосомних транслокаціях, пов'язаних із гематологічними злоякісними пухлинами, корелюють із крихкими ділянками, що частково пояснює поширеність *BCR* як гена-партнера у химерних транслокаційних онкогенах [2].

1.2. Структурна організація та функціональна активність білків BCR, ABL1 та химерного білка BCR-ABL1

1.2.1. Структурно-функціональна характеристика химерного білка BCR-ABL.

BCR-ABL поєднує в собі функціональні домени двох різних білків — *c-ABL* (цитоплазматично-ядерна тирозинкіназа) та *BCR* (сигнальний білок із серин/треонінкіназною активністю). У структурі *BCR-ABL* (рис.1.5.) зберігаються ключові домени *c-ABL*, зокрема: SH2- (*Src*-гомологія 2), SH3-домен, тирозинкіназний домен (SH1), сигнали ядерної локалізації (NLS),

сигнал ядерного експорту (NES), домен зв'язування з ДНК (DBD) та актин-зв'язуючий домен (ABD/FABD) [14,23,24]. Наявність NLS і NES у с-ABL забезпечує йому динамічне транспортування між ядром та цитоплазмою, однак після злиття з BCR ця здатність втрачається: BCR-ABL залишається виключно у цитоплазмі, де проявляє постійну кіназну активність [14]. Зміна субклітинної локалізації є критичною для онкогенної дії білка, оскільки перешкоджає його участі в регуляції апоптозу через ядерні шляхи [23].

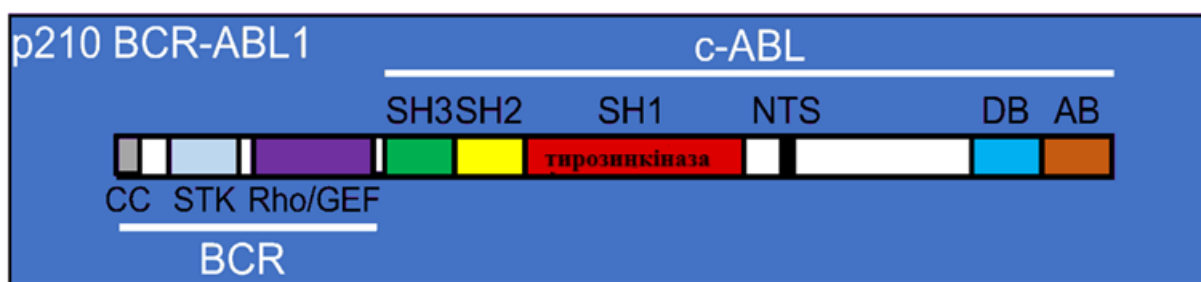


Рис 1.5. Лінійна схема доменної організації p210 BCR-ABL1, яка ілюструє просторове розташування доменів, характерних для обох компонентів химерного білка — BCR і с-ABL. CC — спірально-спіралізований (coiled-coil) домен олігомеризації; STK — серин/треонінкіназний домен; Rho/GEF — домен, що активує Rho ГТФази; SH1, SH2, SH3 — домени гомології до SRC-білків; NTS — сигнал ядерної транслокації; DB — ДНК-зв'язуючий домен; AB — актин-зв'язуючий домен. Адаптовано з [25].

BCR-компонент у складі злитого білка відіграє ключову роль у конститутивній активації тирозинкінази. N-кінцева ділянка BCR містить домен спіральної олігомеризації (coiled-coil, CC), який забезпечує димеризацію та автотрансфосфорилування BCR-ABL, що є критично важливим для його онкогенної активності [2,4,14,26]. Крім того, білок BCR включає домен серин/треонінкінази (STK), домени SH2, сайт зв'язування Grb2 (Y177), білок VAP-1, а також центральний Rho-GEF-домен з плекстрин-гомологічним доменом (PH), який бере участь в активації малих ГТФаз Rac1, Cdc42 та RhoA [2,25,27]. У варіанті BCR-ABL p230 (рис. 1.6.) додатково

присутні кальцій-залежний ліпід-зв'язуючий домен (Cal-B) та RAC-GAP-домен, які беруть участь у регуляції цитоскелету та клітинної рухливості [14,28]. BCR-ABL демонструє постійну тирозинкіназну активність, що значно перевищує базову активність природного c-ABL [14]. Це обумовлює фосфорилування низки сигнальних білків, включаючи Crkl, Shc, Syp, Fes, Vav, що ініціює каскади клітинної проліферації, виживання та диференціювання [2].



Рис.1.6. схематичне зображення доменної організації химерного білка BCR-ABL ізоформи p230. CC — спіраль-спіралізований (coiled-coil) домен олігомеризації; STK — серин/треонінкіназний домен; DH/PH — домени, що активують Rho ГТФази (Rho-GEF активність); C2 — кальцій-залежний модуль націлювання на мембрану (ліпід-зв'язуючий, Cal-B); Rac-GAP — домен активації гідролізу GTP Rac-білків, що регулює актиновий цитоскелет і клітинну рухливість; SH3, SH2, SH1 (Tyr kinase) — домени гомології до SRC-білків, SH1 — тирозинкіназний; PxxP — пролін-багаті мотиви, що зв'язуються з SH3-доменами інших білків; DB — ДНК-зв'язуючий домен; AB — актин-зв'язуючий домен. Адаптовано з [22].

Злитий білок активує ключові сигнальні шляхи: JAK/STAT (особливо STAT5), PI3K/АКТ та Ras/MAPK (рис1.7), що призводить до підвищеної антиапоптотичної активності, резистентності до ІЛ-3-залежного контролю росту та неконтрольованої проліферації клітин [25,29]. Наявність FАBD-домену, консервативного між c-ABL та BCR-ABL, є критичною для регуляції кіназної активності через взаємодію з F-актином. Було показано, що зв'язування з F-актином опосередковує негативний зворотний контроль

тирозинкіназної активності c-ABL, а видалення цього домену може відновлювати активність навіть у неактивних мутантів [23,27,30]. Крім того, FABD впливає на клітинну морфологію, міграцію та формування цитоскелету, що особливо важливо для прогресії пухлинного процесу [27]. Ключовим компонентом онкогенного потенціалу BCR-ABL є його здатність формувати стабільні білкові комплекси з низкою адаптерних та сигнальних молекул. Наприклад, фосфорильований залишок тирозину 177 у BCR (Y177) слугує сайтом зв'язування для білка Grb2, який у свою чергу рекрутує SOS — гуанінну нуклеотидобмінну факторну (GEF) молекулу для Ras, активуючи шлях Ras–Raf–MEK–ERK (рис. 1.7). Це сприяє проліферації та виживанню клітин [22,30]. Іншим важливим субстратом BCR-ABL є CrkL — адаптерний білок, який фосфорилується та слугує маркером активності злитого білка. Підвищена фосфорилляція CrkL спостерігається у клітинах ХМЛ та є чутливим біомаркером відповіді на терапію інгібіторами тирозинкіназ (ІТК) [2,22].

BCR-ABL також активно взаємодіє з РІЗК, що веде до активації серин/треонінкінази Akt. Остання інгібує проапоптотичні білки, як-от Bad і FoxO, та стимулює NF-κB-залежну транскрипцію генів виживання, сприяючи запобіганню програмованій клітинній смерті [32]. Крім того, активність BCR-ABL зумовлює гіперактивацію шляху JAK2/STAT5, що підтримує експресію генів, пов'язаних із проліферацією (наприклад, c-Myc, Bcl-xL), а також самовідновленням гемопоетичних стовбурових клітин [33].

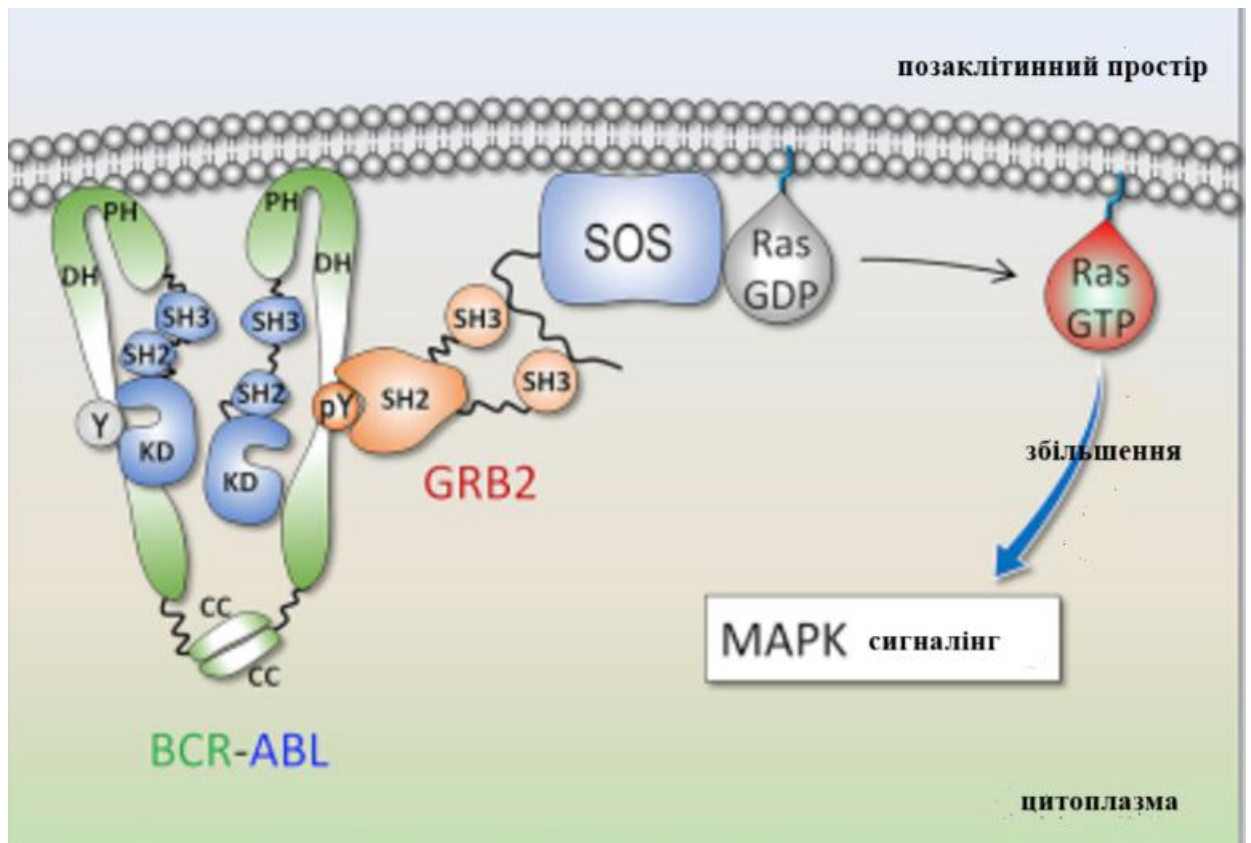


Рис. 1.7. Схематичне зображення активації Ras-сигналіну химерним онкобілком BCR-ABL через рекрутування GRB2. Фосфорилування залишку тирозину (pY) у BCR-домені забезпечує зв'язування адаптерного білка GRB2, який, у комплексі з SOS, активує Ras шляхом обміну GDP на GTP. Активована форма Ras (Ras-GTP) ініціює каскад MAPK-сигналіну, що сприяє проліферації та виживанню клітин. Зображено основні структурні домени BCR-ABL: CC — спіраль-спіралізований домен; DH — Dbl-гомологічний; PH — плекстриновий; SH2/SH3 — домени гомології до Src; KD — кіназний домен. Адаптовано з [27].

Окрім ролі в індукції проліферації, BCR-ABL порушує процеси диференціювання клітин та викликає зміни у структурі цитоскелету. Його взаємодія з білками актинової мережі (такими як Abi1, N-WASP, кортактин) через FABD-домен сприяє формуванню псевдоподій та змін у клітинній морфології, що має значення для інвазивності клітин у пізніх стадіях хвороби [23].

1.2.2. Характеристика кінази ABL1.

До сімейства нерцепторних тирозинкіназ у ссавців належать білки Abl (ABL1) та Arg (ABL2), які мають високий ступінь структурної та функціональної гомології. Ген *ABL1* був ідентифікований як клітинний гомолог трансформуючого гена вірусу лейкемії Абельсона (AMuLV), *v-abl*, і кодує тирозинкіназу, здатну до участі в трансформації клітин [34]. Онкогенна активність ABL1 зумовлена його здатністю до утворення злитих білків — зокрема BCR-ABL1 — внаслідок хромосомної транслокації, що лежить в основі патогенезу філадельфій-позитивних лейкемій [2,4]. Структура ABL1 як вже зазначалося, включає домени SH3, SH2 і тирозинкіназний домен SH1, три мотиви PXXP, актин-зв'язуючий домен, а також елементи ядерної локалізації (NLS), ядерного експорту (NES) та ДНК-зв'язування (рис. 1.8).

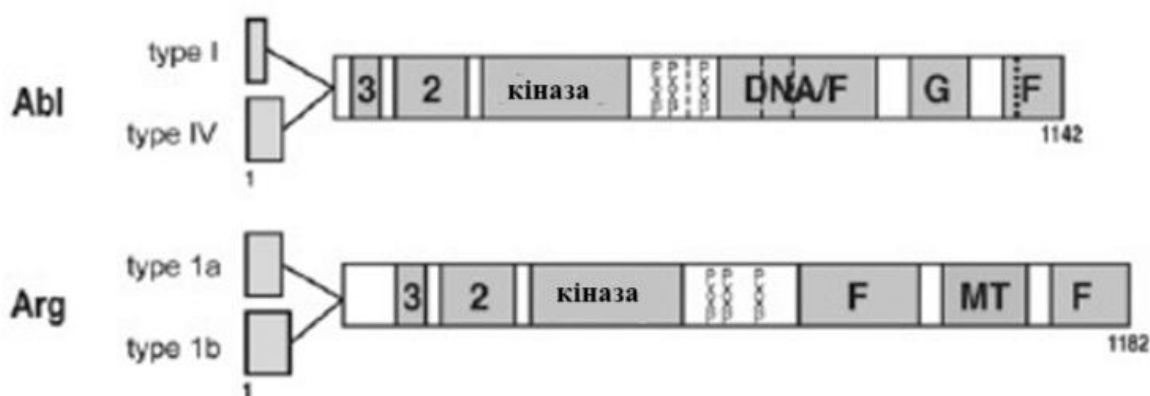


Рис. 1.8. Схематичне зображення структурної організації доменів білків ABL та ARG. Обидва мають альтернативно сплайсовані ізоформи (ABL типу I/IV; ARG 1a/1b) та містять домени SH3, SH2 і тирозинкіназний, з високою гомологією між білками. У С-кінцевій частині виявлено PXXP-мотиви, F-актин-зв'язуючі домени; у ABL також домени зв'язування з G-актином і ДНК, а в ARG — з мікротрубочками. Пунктирними лініями позначено сигнали ядерної локалізації Abl. Адаптовано з [34].

Утримання ABL1 у неактивному стані забезпечується внутрішньомолекулярною взаємодією між доменами SH3/SH2 та

міристыльованим N-кінцевим фрагментом, що зв'язується з гідрофобною кишенею кіназного домену й здійснює автонегативну регуляцію [27,22,34].

Функціонально важливою особливістю є здатність ABL1 до ядерно-цитоплазматичного транспорту, що регулюється через NLS/NES-сигнали, тоді як Arg цих доменів не має. Це дозволяє ABL1 відповідати на внутрішньоклітинні сигнали шляхом зміни локалізації та впливу на транскрипцію, апоптоз або ремоделювання цитоскелету [34].

1.2.3. Молекулярна будова та функціональна активність білка BCR.

Ген *BCR* (breakpoint cluster region) локалізується на довгому плечі 22 хромосоми (22q11) та кодує багатодоменний білок масою приблизно 160 кДа, що бере участь у регуляції клітинної сигналізації, цитоскелетної динаміки, проліферації, диференціювання та виживання клітин [22,35]. Хоча *BCR* вперше був відкритий у контексті хромосомної транслокації t(9;22)(q34;q11), згодом було встановлено, що сам по собі білок Bcr виконує низку важливих фізіологічних функцій [2].

На N-кінці білка розташований кільцевий-домен (coiled-coil domain), що забезпечує димеризацію BCR. Саме ця властивість є критичною для активації тирозинкіназної активності при формуванні химерного білка BCR/ABL, оскільки димеризація спричиняє фосфорилування кіназного домену ABL у складі гібридного білка [2]. Однією з ключових функціональних частин BCR є серин/треонінкіназний домен (рис. 1.9), розташований у N-кінцевій частині молекули, який надає білку власну каталітичну активність. Він здатний до автофосфорилування, зокрема по залишку Ser354, що, ймовірно, модулює його взаємодію з іншими білками та регулює сигнальні каскади [2,25] У центральній частині білка BCR виявлено домени, гомологічні доменам GEF (guanine nucleotide exchange factors), зокрема, RhoGEF. Ці ділянки беруть участь в активації малих GTPаз родини Rho, таких як Rac1 і Cdc42, які відповідають за ремоделювання актинового цитоскелету, адгезію та міграцію клітин [2,36]. Крім того, на C-кінці BCR міститься домен RacGAP, що здатний

негативно регулювати активність Rac1, сприяючи гідролізу GTP до GDP, тим самим завершуючи дію Rac1-сигнального каскаду [2].

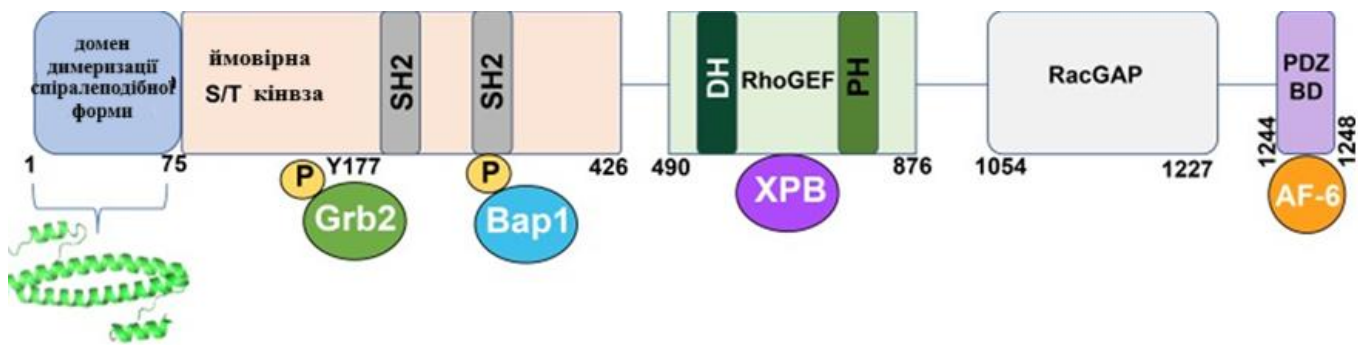


Рис 1.8 Схематичне зображення доменної структури білка BCR. Білок містить coiled coil димеризаційний домен (1–75 а.о.), представлений також у вигляді кристалічної структури димеру. Далі розташовано ймовірний серин/треонінкіназний домен із двома SH2-сайтами зв'язування (до 426 а.о.), що взаємодіють із доменами SH2 білка ABL. Фосфорильований тирозиновий залишок Y177 слугує сайтом зв'язування для адаптерного білка Grb2, тоді як Vap1 взаємодіє через фосфорильовані залишки серину в другому SH2-сайті. Центральна частина BCR включає RhoGEF-домен (490–876 а.о.), що складається з доменів DH і PH, до якого асоціюється білок XPB. С-кінцева частина містить RacGAP-домен (1054–1227 а.о.) та PDZ-зв'язуючий домен (1244–1248 а.о.), який взаємодіє з білком AF-6 через STEV-мотив. Адаптовано з [2].

Функціонально BCR діє як негативний регулятор Rac1, і його недостатність призводить до гіперактивності Rac-залежних шляхів, що в умовах порушеного контролю може сприяти пухлинній трансформації клітин [31]. У нормальних клітинах BCR також бере участь у процесах контролю клітинної морфології, утриманні полярності та адгезивних властивостей.

1.4. Вплив DH–PH доменів на клітинну локалізацію та сигнальні взаємодії BCR-ABL.

Центральна ділянка білка BCR, що охоплює амінокислоти 501–870, містить тандемні домени Dbl Homology (DH) та Pleckstrin Homology (PH) (рис. 1.9), які є типовими структурними мотивами для факторів обміну гуанінових нуклеотидів родини Dbl (RhoGEF) [2]. DH-домен виконує основну функцію каталізу обміну GDP на GTP у малих ГТФазах Rac1, Cdc42 і RhoA, забезпечуючи таким чином активацію цих сигнальних молекул. PH-домен, у складі DH–PH модуля, бере участь у мембранній локалізації, алостеричній регуляції GEF-активності та може прямо впливати на функціональність DH-домену [37,38].

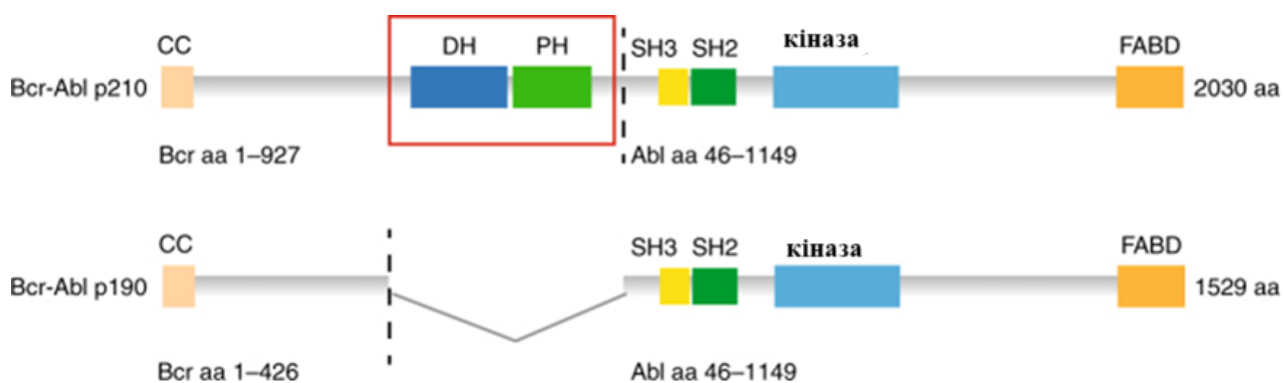


Рис. 1.9. Схематична організація доменів ізоформ p210 та p190 химерного білка BCR-ABL. Зображено їхні розміри та розташування доменів, із зазначенням точки злиття BCR та ABL (позначено пунктирною лінією). CC — спірально-спіралізований домен; DH — Dbl-гомологічний домен; PH — плекстриновий домен; SH2/SH3 — домени гомології до Src; FABD — домен зв'язування з F-актином. Адаптовано з [37].

У складі онкопротеїну BCR-ABL ці домени зберігаються у деяких ізоформах, зокрема, у p210, тоді як в ізоформі p190 DH–PH модуль частково або повністю відсутній [37]. Структурний аналіз DH-домену BCR-ABL,

проведений методом ЯМР-спектроскопії, показав, що цей домен утворює типовий пучок із шести α -спіралей, характерний для Dbl-родини (рис.1.10).

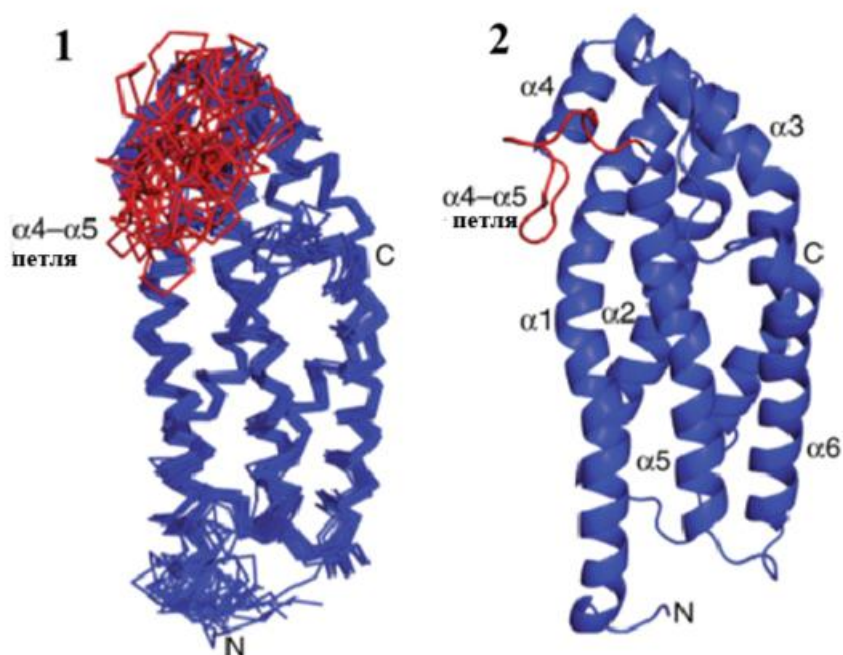


Рис. 1.10. Просторові структури домену DH химерного білка BCR-ABL, отримані методом ЯМР-спектроскопії та рентгенівської кристалografії: 1— група з 20 конформерів, визначених за допомогою ЯМР; гнучка область петлі $\alpha 4$ – $\alpha 5$ (залишки 622–638) виділена червоним; 2 — ЯМР-структура, найближча до середньої, з позначенням шести спіральних елементів та петлі $\alpha 4$ – $\alpha 5$. Адаптовано з [37].

Особливістю DH-домену BCR-ABL є довга й гнучка петля між $\alpha 4$ та $\alpha 5$ спіралями (залишки 622–638), яка є значно довшою, ніж у більшості інших DH-доменів, і не має стабільної конформації [37]. Цей структурний елемент може мати функціональне значення, впливаючи на специфічність або регуляцію взаємодії з ефекторними білками. PH-домен BCR-ABL містить унікальну вставку з 59 амінокислот між $\beta 5$ і $\beta 6$, яка є нетиповою для PH-доменів [37]. Функціонально PH-домен BCR-ABL здатний зв'язувати фосфоінозитид PI(4,5)P2, що сприяє його локалізації на плазматичній мембрані. Це зв'язування, як показано, необхідне для включення білка Sts1 до

сигнального комплексу BCR-ABL p210 і може бути чинником, який визначає специфіку сигналіngu між ізоформами p210 і p190 [37].

Незважаючи на це, головним чинником субклітинної локалізації BCR-ABL залишається F-актин-зв'язуючий домен (FABD), присутній в обох ізоформах [37,23]. Показано, що BCR-ABL p210, на відміну від p190, спричиняє утворення розгалужених F-актинових структур за участі Rac1, що свідчить про активність його GEF-домену [2,37]. В експериментальних моделях делеція DH-домену в складі BCR-ABL p210 знижує трансформувальну здатність білка, пригнічує активацію Rac1 і зменшує клітинну проліферацію та виживання [37]. Це вказує на критичну роль цього домену в патогенезі хронічної мієлолейкемії. Також DH-домен BCR-ABL виявляє активність обміну GDP на GTP для низки малих ГТФаз родини Rho, зокрема Rac1, Cdc42 і RhoA [2,37]. Ці білки є ключовими регуляторами актинового цитоскелету, формування ламеліподій та філоподій, а також процесів клітинної міграції та полярності. Через активацію Rac1 і Cdc42, BCR-ABL сприяє реорганізації актинового каркасу, що призводить до формування псевдоподібних структур і посиленої клітинної рухливості — однієї з характерних рис злоякісно трансформованих клітин [2]. Також існують докази того, що RH-домен, окрім сприяння мембранній локалізації, може безпосередньо брати участь у регуляції сигналіngu через взаємодію з фосфоінозидами та іншими білками. Наприклад, у контексті p210 RH-домен необхідний для формування комплексу зі Sts1-білком, що негативно регулює сигнальні шляхи BCR-ABL шляхом дефосфорилування субстратів тирозинкінази [2,37,39]. RH-домен може виконувати регуляторну функцію в межах сигнального комплексу BCR-ABL.

DH–RH модуль BCR-ABL не лише зберігає класичні властивості RhoGEF-білків, а й має унікальні структурні особливості, що впливають на його стабільність, взаємодії та сигнальні функції. Його присутність у p210, на відміну від p190, може бути важливим чинником у формуванні специфічних сигнальних шляхів, пов'язаних із трансформацією клітин і чутливістю до

терапії [27,2,37]. Просторове розміщення цього модуля в структурі білка може визначати його компартменталізацію в клітині та доступ до специфічних ефекторів (рис. 1.11). Зокрема, для p210 показано переважну асоціацію з актиновим цитоскелетом і мембранними структурами, тоді як p190 має більш цитозольне розташування [27,2]. Наявність DH–PH доменів, очевидно, є одним із факторів, що зумовлюють ці відмінності.

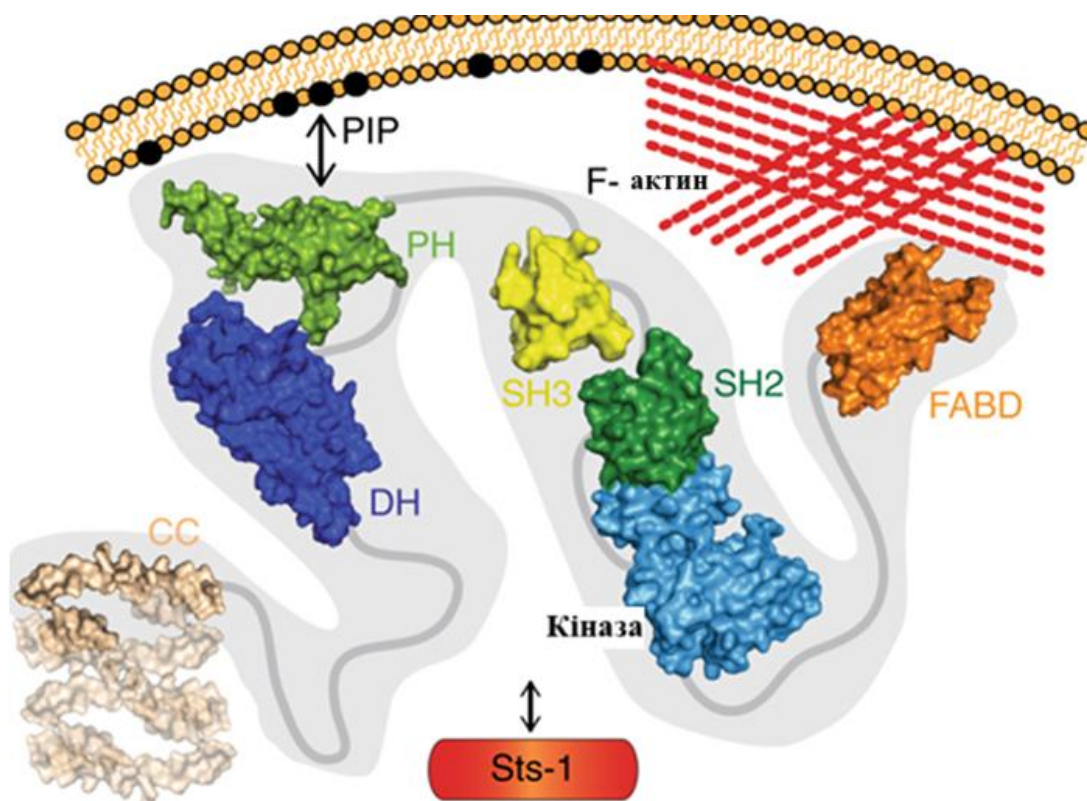


Рис 1.11. Модель структурної організації химерного білка BCR-ABL p210 та його взаємодії з клітинними структурами. Зображено просторову локалізацію основних доменів та асоціацію з актиновим цитоскелетом і залучення регулятора Sts-1: CC — спірально-спіралізований домен; DH — Dbl-гомологічний домен; PH — плекстриновий домен, який взаємодіє з фосфоінозитидами (PIP) мембрани; SH3 та SH2 — домени гомології до Src, що беруть участь у білок-білкових взаємодіях; кіназний домен — центр

тирозинкіназної активності; FABD — домен зв'язування з F-актином. Адаптовано з [37].

1.5. Характеристика білка FBP17

FBP17 (formin-binding protein 17) є представником родини білків, які кодуються геном FNBP1. Цей білок належить до підродини F-BAR-білків (рис.1.12.), функціональною особливістю яких є здатність індукувати кривизну мембрани та брати участь у її динамічній перебудові [40]. Білки, що містять F-BAR-домен, існують у всіх еукаріотів, крім рослин. Ці білки також відомі як білки родини гомології Rombe/Cdc15 (PCH).

EFC-домен зв'язується з фосфоліпідами, зокрема, з $PI(4,5)P_2$, забезпечуючи точкову локалізацію на плазматичній мембрані та ініціюючи її деформацію [42]. Цей домен є ключовим для залучення FBP17 до ділянок активного ремоделювання мембрани, таких як подосоми і фагоцитарні чашки, що збагачені $PI(4,5)P_2$ [42]. SH3-домен FBP17 (рис. 1.13) опосередковує взаємодію з регуляторними білками актинової динаміки — N-WASP, динаміном-2 та іншими — сприяючи одночасному ремоделюванню мембран і полімеризації актину [43]. FBP17 здатен рекрутувати WASP-WIP-комплекс із цитозолу до мембрани, що запускає утворення фагоцитарних структур у макрофагах [42,43].

У контексті ендоцитозу, FBP17 бере участь як у класичних клатрин-залежних, так і клатрин-незалежних шляхах. Його рекрутування до мембрани контролюється Cdc42, що спричиняє мембранне вигинання і формування ендоцитарних пухирців [45]. FBP17 критично необхідний для злиття мембран і рекрутування білків зрощення — зокрема, динаміну-2 [41]. FBP17 є важливим регулятором інвазивної активності пухлинних клітин. Його експресія зростає у випадку раку молочної залози, сечового міхура та шлунка, де він сприяє утворенню інвадоподій, деградації позаклітинного матриксу та метастазуванню [46]. FBP17 взаємодіє з комплексом N-WASP/Arp2/3, що

ініціює локальну полімеризацію F-актину та рекрутує матриксні металопротеїнази MMP2 та MMP9 [43,48].

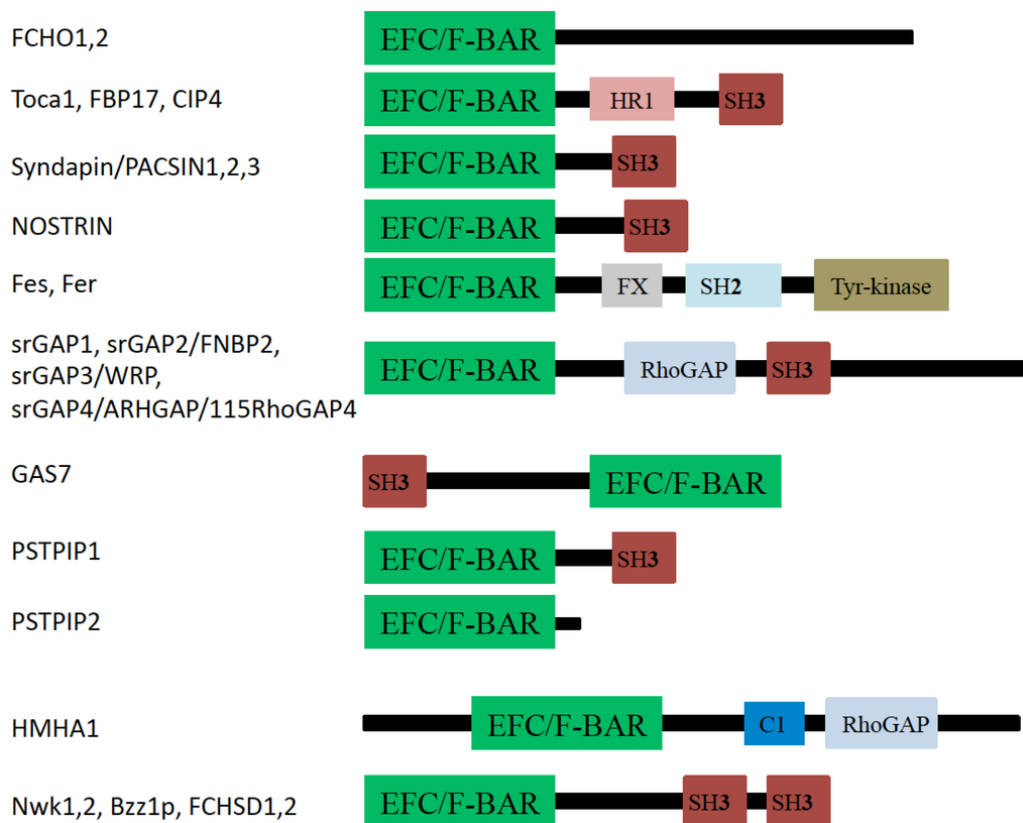


Рис. 1.12. Доменна організація білків родини F-BAR: усі білки містять EFC/F-BAR-домен (зелений), відповідальний за взаємодію з мембраною. Додаткові домени (SH3, HR1, SH2, FX, C1, RhoGAP, тирозинкіназа) визначають функціональну спеціалізацію кожного білка та їхню участь у сигнальних шляхах, цитоскелетній динаміці та мембранному ремоделюванні. EFC (FCH-BAR або F-BAR) — розширений домен гомології FER-CIP4, що забезпечує зв'язування з мембраною; HR1 — домен гомології кінази, пов'язаної з протеїнкіназою C; SH2/SH3 — домени Src-гомології 2 та 3, відповідальні за білок-білкові взаємодії; FX — додатковий домен, асоційований із F-BAR; Tyr-кіназа — домен тирозинкіназної активності; RhoGAP — домен, що регулює активність Rho-ГТФаз; C1 — консервативний домен протеїнкінази C, що бере участь у мембранному зв'язуванні. Адаптовано з [41].



Рис. 1.13. Структура доменів білка FBP17. Білок містить домен гомології FER-CIP4 (FCH) на N-кінці, гомологічну область cdc15, передбачуваний домен зв'язування з Rho-білками та С-кінцевий SH3-домен, що опосередковує білок-білкові взаємодії. Адаптовано з [44].

FBP17 функціонує як ефектор Rho-сімейства ГТФаз — зокрема Cdc42, Rac1, RhoA, — регулюючи перемикання між активною та неактивною формами через взаємодію з RhoGEF/RhoGAP-білками [48,49]. Це забезпечує просторово-часову координацію формування філоподій, ламеллоподій та інвазивних виступів у різних типах клітин. У нейрональних клітинах FBP17 залучений до формування нейритів, синаптичних структур і міграції нейронів. Його наявність спостерігається у зонах активного нейрогенезу під час ембріонального розвитку, а нокаут призводить до порушення міграції та розташування ядер нейронів [48]. Також він є важливим чинником у везикулярному транспорті в нейронах і в розгортанні плазматичних мембран імунних клітин [48].

FBP17 широко накопичується в тканинах ссавців — у нейронах, макрофагах, Т-клітинах, епітелії, де виконує функції, пов'язані з актиновим ремоделюванням, ендоцитозом та утворенням інвагінованих структур [48,41,50]. У пухлинах його збільшення корелює з агресивністю, метастазувальною здатністю та резистентністю до терапії, що робить FBP17 перспективною мішенню для антиракової терапії [46,50].

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Опис об'єкта і предмета дослідження

Об'єктом нашого дослідження є РН-домен білка VCR. Предметом дослідження є молекулярні механізми взаємодії між РН-доменом білка VCR та білком FBP17.

Для виявлення взаємодії застосували методи GST-пулдауну і вестерн-блоту. Конструкцію для бактеріальної експресії гена *FBP17* було отримано шляхом вирізання послідовності, що кодує FBP17, з плазміди FBP17-*pmCherryC1*, яка є дарунком Крістієна Мерріфілда (плазміда Addgene #27688; <http://n2t.net/addgene:27688>; RRID: Addgene 27688). Для бактеріальної експресії FBP17 використовували вектор pGEX 4T-1, у який послідовність FBP17 була субклонувана після вирізання з конструкції FBP17-*pmCherryC1*. pGEX-вектори є ефективними для створення білків із GST-міткою, яку можна виявити за допомогою специфічних антитіл при експресії рекомбінантних генів у бактеріях. Вектори серії pGEX містять *tac*-промотор, експресія якого пригнічується репресорним білком LacI. Цей білок (кодований геном *lacI* або *lacIq*) зв'язується з операторною ділянкою промотора *tac*, блокуючи транскрипцію цільового гена у відсутності IPTG або лактози [51]. Окрім цього pGEX 4T містять селективний маркер стійкості до ампіциліну. Вектор для експресії pET32a-РН з полігістидиновою міткою на N-кінці та вбудованою послідовністю РН домену Vcr/Abl p210 був сконструйований та люб'язно наданий Д. О. Мірошніченко.

2.2. Реактиви, розчини, середовища та обладнання, що були використані в роботі

2.2.1. Реактиви. У дослідженні було використано наступні реактиви: NaCl (ТОВ «Хімлаборреактив», Україна), персульфат амонію, тетраметилетилендіамін (TEMED – tetramethylethylenediamine) («Sigma», США), триптон («Difco», США), екстракт дріжджів («Neofroxx», Німеччина), акриламід («Sigma», США), додецилсульфат натрію SDS (SDS – sodium dodecyl sulfate) («Sigma», США), Tris («Sigma», США), ампіцилін («Arterium», Україна), хлорамфенікол (ТОВ «Хімлаборреактив», Україна), канаміцин («Arterium», Україна), лізоцим («Fluka», США), етилендіамінтетраоцтова кислота EDTA (EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid), гліцин (ТОВ «Хімлаборреактив», Україна), метанол (ТОВ «Хімлаборреактив», Україна), льодяна оцтова кислота (ТОВ «Хімлаборреактив», Україна), Tween 20 («Sigma», США), маркер молекулярних мас O'GeneRuler 1 kb DNA («Thermo Scientific», США), барвник PageBlue Protein Staining Solution («Thermo Scientific», США), Tango Buffer 2x («Thermo Scientific», США), маркер молекулярних мас PageRule Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa («Fermentas», США), H₂O₂ (ТОВ «Тернофар» Україна), люмінол, Р-кумарова кислота, NaOH (ТОВ «Хімлаборреактив», Україна), глюкоза, ацетат калію, персульфат амонію (ТОВ «Хімлаборреактив», Україна), гліцерин (ТОВ «Хімлаборреактив», Україна), бромфеноловий синій, 2-Меркаптоетанол («Thermo Scientific», США), PMSF (фенілметилсульфонілфторид), оцтова кислота, імідазол («Thermo Scientific», США), Vasto Триптон («Thermo Scientific», США), PageBlue Stain (Thermo Scientific, США), 10 x T4 ligase buffer (ThermoFisher Scientific, США), агар-агар (ТОВ «Хімлаборреактив», Україна), агароза, 5 x Loading Buffer з бромфеноловим синім (Thermo Scientific, США), етидій бромід (Sigma-Aldrich, США).

2.2.2. Розчини.

У дослідженні було використано наступні розчини:

- буфер TAE (40 мМ Tris основного, 20 мМ оцтової кислоти, 1 мМ EDTA);
- буфер PBS (150 мМ NaCl, 2 мМ KCl, 5,2 мМ Na₂HPO₄, 1,5 мМ KH₂PO₄, pH 7,4; HCl);
- буфер TBST 10 кратний (9% NaCl, 0,1М Tris-HCl, 1% Tween 20);
- буфери для лужного лізису: S1 ресуспендуєчий буфер (50мМ глюкози, 50мМ Tris-HCl (pH 8,0), 10мМ EDTA), S2 лізуючий буфер (0,2М NaOH, 1% SDS), S3 нейтралізуючий буфер (5М ацетату калію, льодяна оцтова кислота (для доведення pH до 5), dH₂O);
- Tris-HCl (pH 6,8) 4-кратний (1М Tris-HCl, pH довели до 6,8 додаванням HCl);
- Tris-HCl (pH 8,8) 4-кратний (1,5М Tris-HCl, pH довели до 8,8 додаванням HCl);
- блокуючий розчин №1, приготовлений перед застосуванням (0,05% Tween 20 в PBS (приготований безпосередньо перед застосуванням).
- блокуючий розчин №2, приготовлений перед застосуванням (10 мл 5% знежиреного сухого молока в PBS)
- розділяючий гель 12 % 15мл (dH₂O 4,9 мл, Tris 1,5М (pH 8,8) 3,8 мл, 10% SDS 0,15 мл, TEMED 0,012 мл, 30% акриламід 6 мл, 10% персульфат амонію 0,2 мл);
- концентруючий гель 5 % 3мл (dH₂O 2,1 мл, Tris 1,0М (pH 6,8) 0,38 мл, 10% SDS 0,03 мл, TEMED 0,006 мл, 30% акриламід 0,5 мл, 10% персульфат амонію 0,06 мл);
- 6-кратний SDS Loading Buffer для нанесення зразків в SDS поліакриламідний гель (375 мМ Tris-HCl (pH 6,8), SDS 9%, гліцерин 60%, бромфеноловий синій 0,03%, 2-меркаптоетанол 9%, dH₂O);

- буфер для вертикального електрофорезу в поліакриламідному гелі (25мМ Tris, 250 мМ гліцин рН 8,3, 0,1% SDS);
- буфер для переносу (250 мМ гліцин, 25мМ Tris, 20% метанол);
- буфер TAE рН 8,0 (40 мМ Tris, 20 мМ оцтової кислоти, 1 мМ EDTA)
- лізуючий буфер для виділення білків (50 мМ Tris рН 7,5, 300 мМ NaCl, 10 % гліцерину, 0,1% Triton X-100, 1 мМ PMSF, лізоцим 50 мкг/мл, лізоцим та PMSF додаються безпосередньо перед лізисом);
- промивальний буфер для виділення білків (50 мМ Tris рН 7,5, 300 мМ NaCl, 0,1% Triton X-100, 20 мМ імідазолу);
- буфери для елюції:
 - his-злитих білків (50 мМ Tris рН 7,5, 300 мМ NaCl, 0,1% Triton X-100, 250 мМ імідазолу), GST-злитих білків (50 мМ Tris рН 7,5, 10 мМ відновленого глутатіону);
- розчин для підсиленої хемілюмінесценції двокомпонентний (ECL): розчин А (0,1М Tris-HCl (рН 8,5), 2,5 мМ люмінол, 0,4 мМ кумарова кислота), розчин В (0,1М Tris-HCl (рН 8,5), 0,02% H₂O₂).

2.2.3. Живильні середовища.

У дослідженні було використано наступні середовища:

- рідке поживне середовище «LB» (1% Bacto триптон, 0,5% екстракт дріжджів, 1% NaCl, рН – 7,0);
- тверде поживне середовище «LB агар» (1,5% агару, 1% Bacto триптон, 0,5% екстракт дріжджів, 1% NaCl);
- середовище ZYM-505 (1% триптону, 0,5% екстракту дріжджів, 25 мМ Na₂HPO₄, 25мМ Na₂HPO₄, 50 мМ NH₄Cl, 5мМ Na₂SO₄, 0,5% гліцеролу, 0,05% глюкози, 2мМ MgSO₄)
- Середовище для автоіндукції ZYM-5052 (1% триптону, 0,5% екстракту дріжджів, 25 мМ Na₂HPO₄, 25мМ Na₂HPO₄, 50 мМ NH₄Cl, 5мМ Na₂SO₄, 0,5% гліцеролу, 0,05% глюкози, 0,2% α-лактози, 2мМ MgSO₄, 100 мкг/мл селективного антибіотика)

2.2.4. Вектори, плазмиди та біологічний матеріал.

У дослідженні було використано наступні вектори та плазмиди:

- вектор pGEX4T-1 (Addgene# 27458001);
- експресійна конструкція pET32a-PH (надана Д. О. Мірошніченко);
- плазміда FBP17-pmCherryC1 (Addgene #27688);
- *E. coli* штам NEB® Turbo – генотип $F^+ proA^+ B^+ lacI^q \Delta lacZM15 / fhuA2 \Delta(lac-proAB) glnV galK16 galE15 R(zgb-210::Tn10) Tet^S endA1 thi-1 \Delta(hsdS-mcrB)5$
- *E. coli* штам BL21 Rosetta – генотип $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm (DE3) pRARE (Cam^R)$

2.2.5. Ферменти.

У дослідженні було використано наступні ферменти:

- ендонуклеази рестрикції: BglII, EcoRI, BanHI, **HindIII** («Thermo Scientific», США), буфери Fast та Tango («Thermo Scientific», США);
- лігаза T4 DNA Ligase («Thermo Scientific», США), буфер T4 DNA Ligase buffer («Thermo Scientific», США).

2.2.6. Антитіла.

У дослідженні було використано наступні антитіла:

- первинні антитіла проти полігістидину (#MAB3844 Sigma Aldrich, США);
- вторинні HRP-кон'юговані козячі антимишачі антитіла (ABclonal Technology, США).

2.2.7. Обладнання та витратні матеріали.

У дослідженні було використано таке лабораторне обладнання та приладдя: велика центрифуга (ELMI CM-50), мала центрифуга з охолодженням (Eppendorf 5415 R), апарат для вертикального електрофорезу та вертикальна камера для електроблоту – (BioRad MiniProtean Tetra Cell, США), спектрофотометр Nanodrop 2000 (Bio-Rad, США), камера для горизонтального електрофорезу в агарозному гелі (Helicon, Росія), джерело живлення для камери електрофорезу “Эльф-4” (ДНК-технология, Росія), система BioRad

Chemidoc, ультразвуковий дезінтегратор (Thermo Scientific, США), холодильник Nord (Німеччина), кальвінатор Sanyo (Японія), транслюмінатор, термостат ТС-80М-2 (АО “Медлабортехніка”, Росія), орбітальний шейкер, ваги (Axis, Польща) водяна баня (MLW, Польща), рН-метр.

У дослідженнях було використано такі витратні матеріали: автоматичні піпетки 100 – 1000 мкл, 0,1 – 2 мкл, 2 – 20 мкл, 20 – 200 мкл (Eppendorf, США), нітроцелюлозна мембрана (Sartorius, Німеччина), мікроцентрифужні пробірки об’ємом 1,5 мл та 0,2 мл (EximLab, Україна), наконечники для автоматичних піпеток (ООО “Паритет”, Україна), пластикові флакони об’ємом 50 та 20 мл (ООО “FALCON”, Україна), колонки PD-10, скляні флакони об’ємом 250, 500 та 800 мл, паперові фільтри, рукавички.

2.3. Методи дослідження

2.3.1. Приготування компетентних клітин *E. coli*.

Для приготування хімічно компетентних клітин *E. coli* штам BL21 Rosetta та *E. coli* штам NEB® Turbo висіяли на LB-агар із додаванням 50 мкг/мл селективного антибіотика та інкубували протягом 12–18 годин при 37°C за умов інтенсивної аерації. Далі клітини з поодиноких колоній перенесли в стерильний флакон з 10 мл рідкого середовища LB з додаванням 50 мкг/мл селективного антибіотика і культивували в термостаті при постійному перемішуванні при 37°C до досягнення оптичної густини OD₆₀₀ близько 0,5. Подальші етапи виконували при охолодженні. Культуру охолоджували на льоду протягом 10 хвилин, після чого відцентрифугували при 8000g, 4°C протягом 10 хвилин. Відібрали супернатант, а осад клітин обережно ресуспендували у 5 мл охолодженого 0,1М розчину CaCl₂ і витримали на льоду 30 хвилин. Після повторної центрифугації за тих самих умов супернатант відібрали, а осад ресуспендували в 1 мл охолодженого 0,1М CaCl₂, що містив 15% гліцерину [52]. Отриману суспензію порційно

розподілили по 50 мкл у стерильні охолоджені пробірки, та зберігали при -80°C .

2.3.2. Трансформація компетентних клітин методом теплового шоку.

Для проведення трансформації використали хімічно компетентні клітини *E. coli* NEB® Turbo, які зберігалися при -80°C . Безпосередньо перед трансформацією клітини розморозили на льоду протягом 20–30 хвилин. До 50 мкл суспензії клітин додали 1–5 мкл плазмідної ДНК FBP17-pmCherryC1 (вмістом 10нг), після чого вміст пробірки обережно перемішали та залишали на льоду на 30 хвилин. Наступним етапом був тепловий шок, який здійснили шляхом інкубації пробірок у водяній бані при температурі 42°C протягом 90 секунд. Після цього пробірки одразу охолодили на льоду протягом 1–2 хвилин. Далі до кожної трансформаційної суміші додали подвійний об'єм рідкого поживного середовища LB (без антибіотика) та інкубували клітини за температури 37°C при постійному перемішуванні та інтенсивній аерації протягом 45–60 хвилин. Далі 100 мкл клітинної суспензії висіяли на чашки Петрі з твердим поживним середовищем LB, до якого попередньо додали відповідний селективний антибіотик: ампіцилін для pGEX4T-1, канаміцин для FBP17-pmCherryC1. Чашки інкубували при температурі 37°C при інтенсивній аерації протягом 12–16 годин до появи колоній [53].

2.3.3. Створення генетичної конструкції pGEX4T1-FBP17.

2.3.3.1. Отримання плазмідної ДНК з клітин *E. Coli* методом лужного лізису.

З попередньо трансформованих лігазною сумішшю фрагментів FBP17 та pGEX-4T-1 клітин *E. Coli* стерильною зубочисткою відібрали поодинокі колонії та висіяли у 50–100 мл рідкого LB-середовища з селективним антибіотиком та інкубували при 37°C при постійному перемішуванні та інтенсивній аерації протягом 16–18 годин. Після чого культуру перенесли в

15мл флакони та відцентрифугували при 5000–10000 об./хв протягом 30 хв, супернатант видалили, залишивши клітинний осад. Плазмідну ДНК виділяли за допомогою методу лужного лізису. Клітинний осад ресуспендували у ресуспендуючому буфері S1 та витримали 10 хв на льоду. Після чого до пробірки додали подвійний об'єм лізуючого буфера S2, обережно перемішали до повного посвітління розчину та інкубували за кімнатної температури 10 хвилин. Далі додали нейтралізуючий буфер S3, знову перемішали до утворення характерного слизу та витримали 10 хвилин на льоду. Отриману суміш очистили від клітинних залишків за допомогою фільтрувального паперу та відцентрифугували при 4 °C на 13000 об./хв протягом 20 хвилин. Відібрали верхню фракцію до нових пробірок та додали 0,7–1 об'єму ізопропанолу, перемішали та інкубували за кімнатної температури 60 хвилин. Осад плазмідної ДНК осадили центрифугуванням при 10000 об./хв протягом 30 хв. Після чого осад промили 70% етанолом, повторно відцентрифугували та злили супернатант. Осад висушили при 37 °C до повного висихання та ресуспендували в 500 мкл дистильованої води [54].

2.3.3.2. Очищення плазмід.

Для очищення від РНК до ресуспендованої ДНК додали 0,5 об'єму 4,2М розчину CaCl_2 , перемішали та відцентрифугували при 16000 G протягом 10 хв. Надосад перенесли в нову пробірку, додавали 0,6 об'єму ізопропанолу, осаджували ДНК, промивали 70% етанолом, висушували осад та розчиняли його у 100 мкл дистильованої води.

2.3.3.3. Ферментативна обробка плазмідної ДНК.

Для створення рекомбінантної конструкції pGEX4T1-FBP17 провели рестрикцію вектора pGEX-4T-1 та вставки FBP17 з плазміди pmCherry-FBP17. Концентрацію плазмідної ДНК виміряли за допомогою спектрофотометра. pmCherry-FBP17 — 120 нг/мкл, pGEX-4T-1 — 80 нг/мкл. На основі отриманих значень розраховано об'єми для рестрикційних реакцій. Реакції були проведені у загальному об'ємі 20 мкл з використанням відповідних рестриктаз: для вставки EcoRI/BglII та для вектора EcoRI/BanHI. Реакції

інкубували протягом 2 годин при 37 °С, після чого ферменти було інактивовано нагріванням до 80 °С протягом 20 хв.

pmCherry-FBP17	
dH ₂ O	До 20 мкл
FAST Буфер	2 мкл
Плазміда	3 мкл
EcoRI	0,2 мкл
BglII	0,2 мкл

pGEX-4T-1	
dH ₂ O	До 20 мкл
FAST Буфер	2 мкл
Плазміда	5 мкл
EcoRI	0,2 мкл
BanHI	0,2 мкл

2.3.3.4. Електрофоретичне розділення та очищення фрагментів ДНК після рестрикції.

Для перевірки ефективності рестрикції та подальшого виділення фрагментів ДНК провели електрофорез у 1% агарозному гелі з використанням ТАЕ-буфера. Гель було приготовано шляхом розчинення 0,3 г агарози в 30 мл 1× ТАЕ. Після охолодження гель залили в касету зі слотами. До кожного зразка додали 1 мкл 5× Loading Buffer, що містив бромфеноловий синій для візуалізації фронту міграції. Далі внесли зразки та маркер молекулярної маси. Електрофорез провели при напрузі 100 В протягом 40–45 хвилин. Після завершення гель забарвлювали у розчині бромистого етидію приблизно 10 хвилин. Візуалізацію результатів здійснили в ультрафіолетовому світлі за допомогою транслюмінатора.

Смуги гелю, що відповідали за розміром цільовим фрагментам ДНК, були вирізані вручну після електрофорезу. Для очищення ДНК використали метод колонкової екстракції. Вирізаний фрагмент зважили та додали буфер для розчинення у співвідношенні 4:1 (буфер:гель). Перемішали та витримали при 55 °С до повного розчинення, отриману суміш пропустили через очищувальні колонки, двічі промивши буферами, спочатку з високою, а потім з низькою іонною силою. Очищену ДНК змили з колонок 20 мкл дистильованої води.

2.3.3.5. Лігування.

Реакцію лігування рестрикованого вектора та вставки провели при 16 °С протягом ночі. Після завершення реакції, лігазу було інактивовано нагріванням до 65 °С протягом 10 хвилин. Реакція була проведена у загальному об'ємі 20 мкл з використанням стандартної лігазної суміші із Т4 ДНК-лігазою та відповідним буфером.

10 x T4 ligase buffer	2 мкл
Вектор	50 нг
Вставка	100 нг
АТФ	0,5 мМ
10 x T4 ligase	10 одиниць
dH ₂ O	9 мкл

Після завершення процедури лігування отриману лігазну суміш було застосовано для трансформації компетентних клітин *E. coli* BL21 Rosetta, згідно з протоколом, описаним у розділі 2.3.2. Трансформація компетентних клітин відбувалась методом теплового шоку. Крім того, було проведено трансформацію з використанням експресійної конструкції рЕТ28с-РН.

2.3.4. Експресія та очищення рекомбінантних білків.

Плазмиди були трансформовані в хімічно компетентні клітини *E. coli* BL21 Rosetta методом теплового шоку та висіяні на LB агар із ампіциліном і хлорамфеніколом, інкубували при 37 °С за умов інтенсивної аерації 18 годин. Стерильною зубочисткою відібрали поодинокую колонію та висіяли в 5 мл середовища ZYM-505 [63] з ампіциліном та хлорамфеніколом в якості селективних антибіотиків та інкубували з постійним перемішуванням при +37 °С, за умов інтенсивної аерації 18 год. Після чого відібрали 200мкл для подальшого аналізу. Далі стартову культуру перенесли в 100 мл середовища ZYM-5052 для автоіндукції [63] та інкубували з постійним перемішуванням

при 37 °C за умов інтенсивної аерації до досягнення OD600 0,5, після чого знизили температуру до 20–22 °C і інкубували ще 18–24 год з постійним перемішуванням за умов інтенсивної аерації. Відібрали 200 мкл культури після індукції для подальшого аналізу. Після індукції клітини осадили центрифугуванням 2000 g, 20 хв, відібрали супернатант (для аналізу), отриманий осад перемішали та ресуспендували в 10 мл холодного PBS, що містить 1 mM PMSF та 100 мкг/мл лізоциму, та інкубували на льоду 30 хв. Лізат піддали ультразвуковій дезінтеграції протягом 6 циклів, 10-секундний імпульс, після якого 10-секундний період паузи; всі цикли проводили на льоду. Лізат відцентрифугували при 16000g протягом 20 хвилин за +4 °C. Супернатант було відібрано в нові пробірки для подальшої афінної очистки, також було відібрано супернатант для подальшого аналізу білків, що містяться в розчинній фракції лізату.

Подальший процес афінної очистки залежав від типу мітки на білках, полігістидин (his) або GST. Рекombінантний домен PH із His-міткою було очищено на колонці з нікель-афінною смолою, врівноваженою PBS, а GST-мічені білки було очищено з використанням глутатіон-сефарози.

Афінна очистка для his-мітки. На гравітаційну колонку об'ємом 8 мл завантажили 200 мкл смоли, яку кілька разів промивали PBS. Лізат, що містить рекombінантний домен PH білка BCR, нанесли на колонку та пропустили під дією сили тяжіння. Далі колонку промили 10 об'ємами PBS з 10 mM імідазолу для видалення неспецифічно зв'язаних білків та відібрали для аналізу. Білок елюйовано 3 об'ємами PBS з 300 mM імідазолу. Отриманий елюат знесолили проти буфера PBS за допомогою спеціальної знесолювальної колонки PD-10 [63], дотримуючись інструкції виробника. Відібрали для аналізу. Усі відібрані для аналізу зразки кип'ятили протягом 5 хвилин в 4x буфері для завантаження та аналізували за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі.

Афінна очистка для GST мітки. Лізат змішали з 200 мкл PBS, врівноваженої глутатіон-сефарозою, та інкубували 4 год при +4 °C з постійним перемішуванням. Суспензію було осаджено центрифугуванням при 500 g

протягом 1 хвилини за +4 °С, супернатант видалили (для аналізу), та тричі промили в PBS для видалення незв'язаних білків. Отриману суспензію використали для подальшого аналізу та GST-пулдауну. Усі відібрані для аналізу зразки кип'ятили протягом 5 хвилин в 4х буфері для завантаження та аналізували за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі.

2.3.4.1. Денатуруючий електрофорез в поліакриламідному гелі.

Для аналізу білків було проведено денатуруючий ПААГ-електрофорез. Для денатуруючого ПААГ-електрофорезу приготували 12% розділяючий та 5% концентруючий гелі.

Розділяючий гель							
Складові	5мл	10мл	15мл	20мл	25мл	30мл	40мл
12%							
• Н2О	1,6	3,3	4,9	6,6	8,2	9,9	13,2
• акриламід 30%	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	16,0
• 1,5М Tris (рН 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0
• SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4
• Персульфат амонію 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4
• TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016
Концентруючий гель 5%							
Складові	1мл	2мл	3мл	4мл	5мл	6мл	8мл
• Н2О	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5
• акриламід 30%	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1,0	1,3
• 1,5М Tris (рН 6,8)	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1,0
• SDS 10%	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08
• Персульфат амонію 10%	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08
• TEMED	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008

Полімеризацію ініціювали додаванням персульфату амонію та TEMED. Електрофорез провели при 150 В протягом ~2 годин. Для оцінки молекулярної маси білків використали маркер PageRuler Plus Prestained Protein Ladder. Після електрофорезу гель тричі промили гарячою дистильованою водою для видалення SDS та забарвили барвником PageBlue Stain.

2.3.5. GST-пулдаун.

До суспензії глутатіон-сефарози, що містить білок інтересу, та до глутатіон-сефарози лише з GST, додали рівні кількості очищеного РН-домену. Зразки інкубували за температури +4 °С протягом ночі з постійним перемішуванням. Після інкубації гелеподібну суспензію відцентрифугували при 500 g протягом 1 хвилини при +4 °С, супернатант відібрали для аналізу. Осад тричі промили фосфатно-сольовим буфером, щоб усунути білки, що неспецифічно зв'язались. Для елюювання білків, зв'язаних з GST, до глутатіон-сефарози додали буфер для елюції та інкубували, постійно перемішуючи при +4 °С протягом 3 годин. Після цього суспензію осадили шляхом центрифугування при 13000 g протягом 10 хвилин при +4 °С. Отриманий супернатант, що містив елюйовані білки, перенесли в чисті пробірки для подальшого аналізу [56,63]. Усі відібрані для аналізу зразки кип'ятили протягом 5 хвилин в 4x буфері для завантаження та аналізували за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі.

2.3.6. Вестерн блот аналіз.

2.3.6.1. Проведення електрофорезу та перенесення білків на мембрану.

Елюйовані після GST-пулдауну білки змішали з буфером для завантаження та нанесли на 12% поліакриламідний гель разом з 5 мкл маркера

молекулярної маси. Електрофорез проводили при постійній напрузі 120 В до виходу фронту барвника за межі гелю.

Після завершення електрофорезу вирізали необхідну ділянку гелю та перенесли на нітроцелюлозну мембрану з порами 0,22 мкм у системі для вологого блотування при струмі 200 мА протягом 2 годин. Для підготовки до переносу всі елементи — губки, фільтрувальний папір, мембрану та гель — попередньо змочили в буфері для переносу. Потім з гелю та нітроцелюлозної мембрани сформували “сендвіч”, уникаючи попадання повітря між шарами. Шари склали в такому порядку: негативний електрод, плата, фільтрувальний папір, гель, нітроцелюлозна мембрана, знову фільтрувальний папір, плата і позитивний електрод, та розмістили в камері для вологого перенесення. Ефективність перенесення контролювали за видимістю маркера на мембрані [57].

2.3.6.2. Блокування мембрани та імунодетекція

Мембрану інкубували у 10 мл 5% знежиреного сухого молока в PBS протягом 1 години при кімнатній температурі на орбітальному шейкері для блокування неспецифічних ділянок. Далі її інкубували з первинними мишачими антитілами проти His-тегу, розведеними 1:400 у 5% знежиреному сухому молоці в PBST, протягом ночі при +4 °С. Після інкубації мембрану тричі було промито PBST, по 10 хвилин кожне промивання. Потім додали 10 мл вторинних козячих антимишачих антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрому, у розведенні 1:5000 в PBST, та інкубували 1 годину при кімнатній температурі. Після цього мембрану знову тричі промили PBST [58].

Для візуалізації білків використали розчин для підсиленої хемілюмінесценції двокомпонентний. Розчин А та розчин В змішали безпосередньо перед інкубацією. Мембрану інкубували з 1 мл цього буфера протягом 1 хвилини, після чого хемілюмінесцентний сигнал детектували за допомогою системи BioRad ChemiDoc з попередньо оптимізованим часом експозиції.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Створення генетичної конструкції pGEX4T1-FBP17

Для створення генетичної конструкції було використано повнорозмірну послідовність гена FBP17, взяту з плазміди pmCherry-FBP17, та вектор pGEX-4T1 (рис.3.1), призначений для експресії білків з GST-міткою. Клонування здійснювали за допомогою рестрикційного розрізання: вектор pGEX-4T1 обробляли ферментами EcoRI та BanHI, тоді як фрагмент гена *FBP17* вирізали ферментами BglII та EcoRI. Отримані фрагменти лігували з використанням ДНК-лігази. Оскільки розмір вставки – 1850 п.н [59], а розмір вектора pGEX-4T1 – 4969 [60]. Отже, очікуваний розмір отриманої конструкції складав приблизно 6819 пар нуклеотидів.

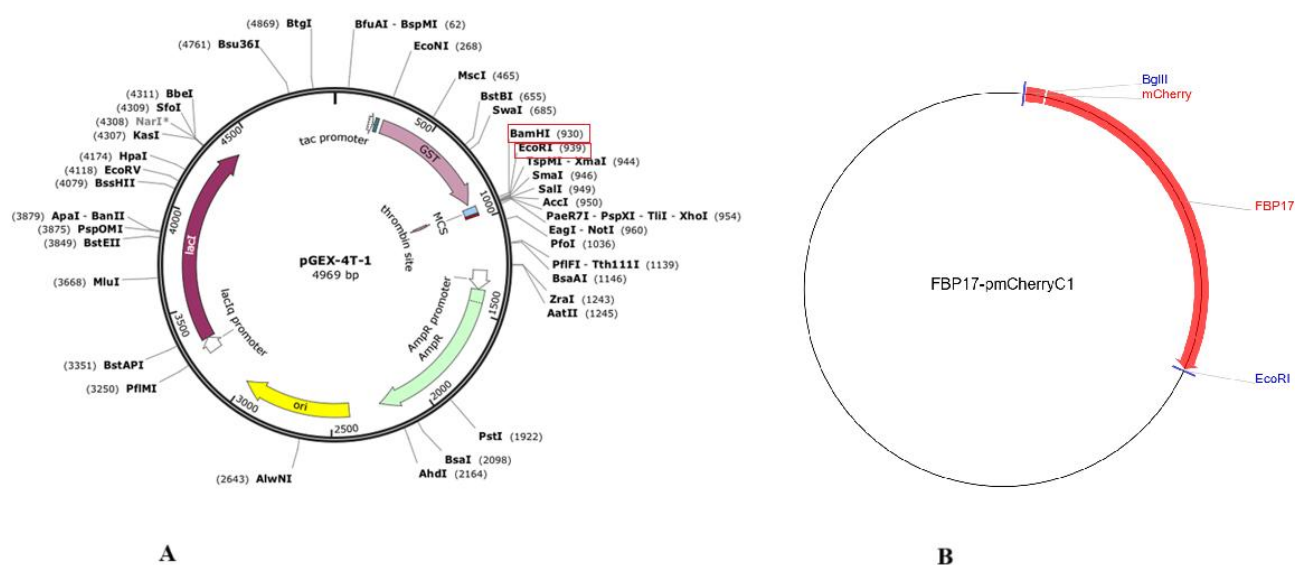


Рис. 3.1. Схематичне зображення плазмід: А – pGEX-4T1; В – pmCherryFBP17. Адаптовано з [61].

Для перевірки наявності конструкції в отриманих зразках проводили рестрикційний аналіз із використанням ферменту HindIII, таким чином, при наявності плазміди з правильно інтегрованою вставкою очікувалося утворення

єдиної ДНК-смуги приблизно 6800 п.н. Після обробки зразків плазмід та електрофоретичного розділення фрагментів ДНК було виявлено, що у зразках №2, 3 і 5 на електрофореграмі по дві смуги різної молекулярної маси (рис.3.2), що може свідчити про часткове розщеплення суперспіральної форми плазмідної або наявність лінійної, а також про неповне лігування вставки. У зразках №4 і 6 (рис.3.2) сигнал відсутній або дуже слабкий, що, ймовірно, зумовлено низькою концентрацією плазмідної ДНК. Таким чином, лише зразок №1 (рис.3.2) відповідав критеріям для подальшого використання, оскільки демонстрував характерну одну смугу та найближчий розмір до очікуваного розміру конструкції, що підтверджує коректність складання конструкції. Цей зразок був обраний для подальшого дослідження.

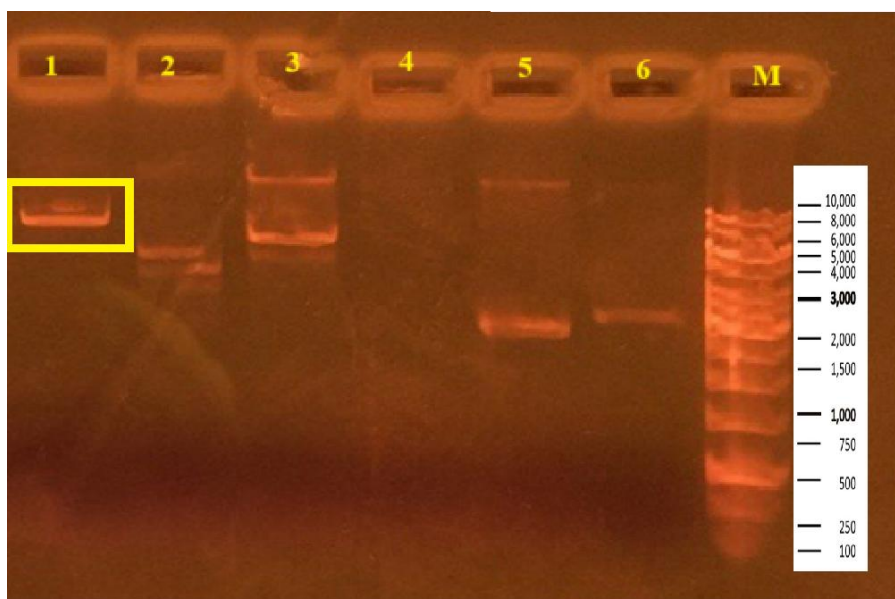


Рис. 3.2. Аналіз результатів клонування генетичної конструкції рGEX4T1-FBP17 методом рестрикційного аналізу за допомогою гелелектрофорезу: 1-6: Плазмідна ДНК, виділена з 6 бактеріальних колоній після лігування та оброблена рестриктазою HindIII ; М – маркер 1 kb DNA Ladder.

3.2. Оцінка експресії рекомбінантного білка GST-FBP17 методом SDS-PAGE

Для аналізу участі білка FBP17 у клітинних процесах, пов'язаних з BCR/ABL, було проведено експресію конструкта pGEX4T1-FBP17 у клітинах *E. coli* BL21 Rosetta з використанням автоіндукційного середовища ZYM-5052. Результати експресії аналізовано методом SDS-PAGE (рис.3.3). У зразку до індукції (зразок 1) спостерігався типовий набір ендогенних білків *E. coli*, без виражених смуг у діапазоні очікуваної молекулярної маси білка FBP17. У зразку після індукції α -лактозою (зразок 2) з'явилась інтенсивна білкова смуга з молекулярною масою близько 100 кДа. Ця смуга відповідає сумарній молекулярній масі рекомбінантного білка GST-FBP17, який складається з GST-тегу (приблизно 25 кДа) та білка FBP17 (приблизно 71 кДа [63]). Збільшення інтенсивності даної смуги після індукції свідчить про ефективну експресію цільового білка у розчинній фракції клітинного лізату.

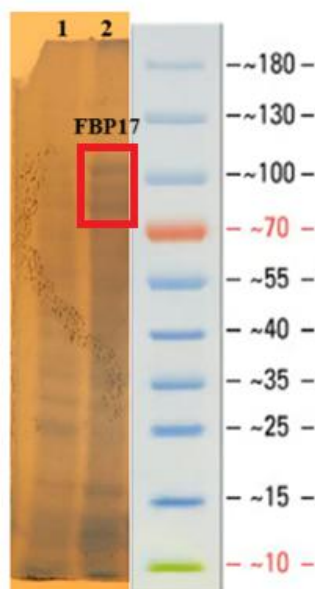


Рис. 3.3. Електрофореграма розділення білків для оцінки індукції синтезу білків. 1 – до індукції; 2 – після індукції; маркер молекулярних мас PageRule Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa.

3.3. Перевірка взаємодії домену PH білка BCR з GST-FBP17 методом GST-пулдауну за допомогою SDS-PAGE

Рекомбінантний PH-домен білка BCR було очищено з розчинної фракції за допомогою Ni-NTA-агарози та елюйовано буфером, що містить 250 мМ імідазолу. Білки GST та GST-FBP17 були очищені шляхом афінної хроматографії на глутатіон-сефарозі. Отриманий PH-домен було піддано діалізу проти буфера для пулдауну. Для дослідження потенційної взаємодії PH-домен інкубували з іммобілізованим на глутатіон-сефарозі білком GST-FBP17 протягом 14 годин при +4 °C із постійним перемішуванням. Як негативний контроль проводилась аналогічна інкубація з іммобілізованим GST-білком без FBP17. Після інкубації глутатіон-сефарозу ретельно промивали для видалення незв'язаних білків, а зв'язані комплекси елюювали буфером для GST-білків, що містив 10 мМ відновленого глутатіону. Для контролю неспецифічного зв'язування також використовували глутатіон-сефарозу без приєднаного рекомбінантного білка. Для підтвердження наявності рекомбінантних білків та оцінки їх взаємодії було проведено електрофорез у поліакриламідному гелі з SDS (SDS-PAGE) (рис 3.4) з подальшим забарвленням PageBlue Stain

У розчинній фракції після індукції (зразок 1) експресії конструкції pGEX4T1-FBP17 спостерігається інтенсивна смуга (рис 3.4), що вказує на успішну експресію та розчинність білка. Фракція, яка не зв'язалась із глутатіон-сефарозою (зразок 2), містить значно меншу кількість білка GST-FBP17, що свідчить про ефективне зв'язування білка з афінною колонкою та успішне очищення (рис 3.4).

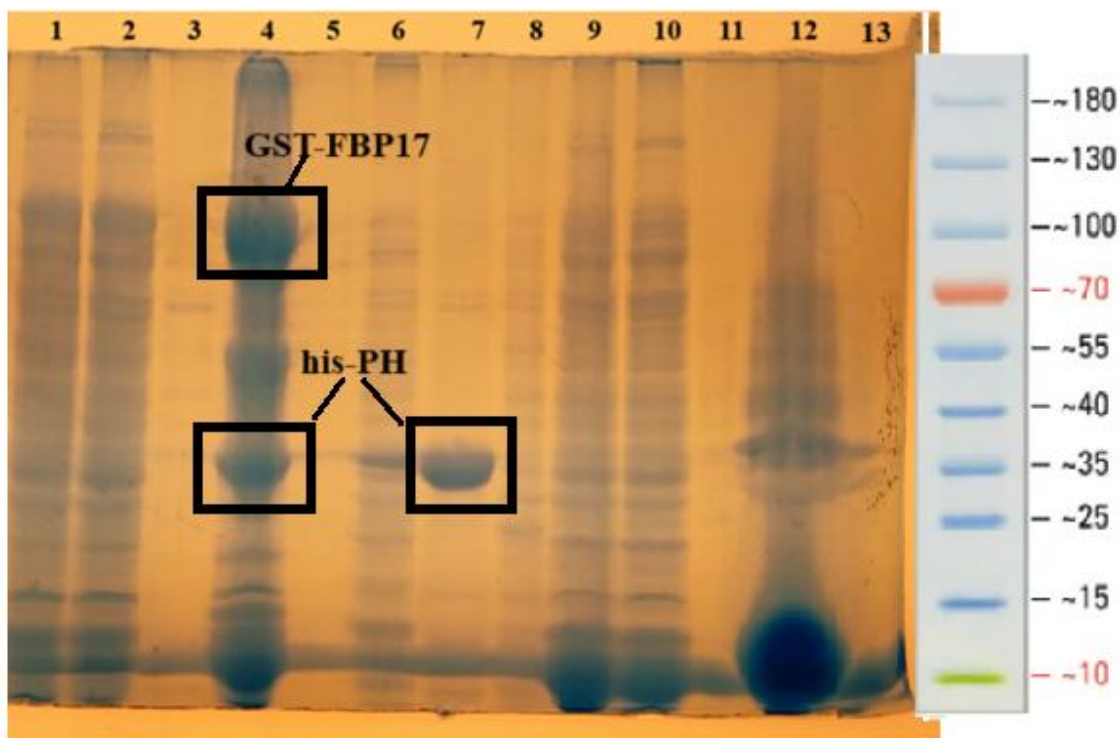


Рис. 3.4. Електрофореграма аналізу експресії та взаємодії білків GST-FBP17 та PH-домену білка BCR: 1– рGEX4T1-FBP17 розчинна фракція; 2 – рGEX4T1-FBP17 фракція, яка не зв'язалася з глутатіон-сефарозою; 3 – фракція рекомбінантного домену PH, яка не зв'язалася з фракцією GST-пулдауну; 4 – фракція GST-пулдауну домену PH та GST-FBP17; 5 – пропуск; 6 – розчинна фракція рЕТ32aPH; 7 – очищений рекомбінантний домен PH; 8 – фракція клітин *E. Coli* до індукції; 9 – розчинна фракція клітин *E. Coli*, що експресують GST, після індукції; 10 – фракція клітин *E. Coli*, що експресують GST, що не зв'язалася з глутатіон-сефарозою; 11 – пропуск; 12 – фракція GST-пулдауну між рекомбінантний доменом PH та GST.

Для перевірки взаємодії між білком FBP17 і PH-доменом було проведено GST-пулдаун. У 3 зразку (рис.3.4), де проаналізовано PH-домен, що не зв'язався з FBP17, інтенсивність смуги є дуже низькою, майже відсутньою, що вказує на специфічне зв'язування з FBP17. У зразку 4 (рис.3.4), який містить елюат після GST-пулдауну, спостерігаються дві характерні смуги — одна відповідає білку GST-FBP17, інша — домену PH, що свідчить про пряму

взаємодію між цими білками. У зразках 6 та 7 (рис.3.4) проаналізовано експресію та очищення домену РН. У розчинній фракції зразок – 6 і після очищення – зразок 7 спостерігається інтенсивна смуга. Висока інтенсивність та чистота смуги після очищення свідчать про успішне отримання функціонально активного РН-домену. Відсутність смуги РН-домену у зразку 13 показує (рис.3.4), що РН-домен не зв'язується з самим GST-тегом. Це підтверджує, що зв'язування РН-домену, яке спостерігається у 4 зразку, є специфічним до FBP17, а не до GST.

3.4. Візуалізація взаємодії білків РН-домену BCR та FBP17 методом вестерн-блот

Для підтвердження експресії та перевірки чистоти рекомбінантних білків було проведено вестерн-блотинг (рис.3.5) із використанням антитіл проти відповідних міток, а саме, первинні моноклональні антитіла проти полігістидину та вторинні HRP-кон'юговані козячі антимишачі антитіла.

У 1 зразку (рис.3.5) виявлено чітку сигнал-смугу на рівні приблизно 40 кДа, що відповідає рекомбінантному білку РН-домену, експресованому у складі конструкта з His-міткою (his-RN). Така молекулярна маса відповідає очікуваній для злитого білка РН-домену з His-тегом. У зразку 4 (рис.3.5) спостерігалась інтенсивна сигнал-смуга, що свідчить про ефективне зв'язування білка з глутатіон-сефарозною смолою та його успішну елюцію. Виявлення смуги у лунці 4 та її відсутність у 3 вказує на пряму взаємодію між FBP17 та РН-доменом BCR. Частину результатів, отриманих у цьому дослідженні, було попередньо опубліковано у науковій статті (Гур'янов та ін., 2025) [63].

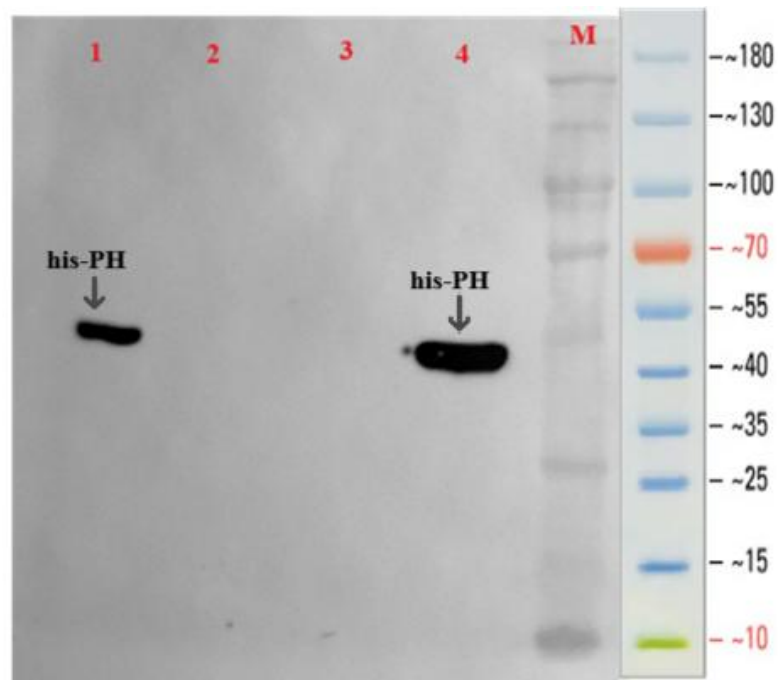


Рис. 3.5. Вестерн-блот аналіз результатів GST-пулдауну [63]: 1 – елюат, що містить His-мічений PH-домен білка BCR; 2 – загальний лізат клітин, у яких була експресія рекомбінантного GST-FBP17; 3 – фракція елюції білка GST, зв’язаного з глутатіон-сефарозною смолою; 4 – фракція елюції GST-FBP17, що зв’язувався з глутатіон-сефарозою; 5 – маркер молекулярної ваги.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У межах цієї роботи було досліджено можливу фізичну та функціональну взаємодію між білком FBP17 та PH-доменом гібридного онкобілка BCR-ABL, що утворюється внаслідок хромосомної транслокації t(9;22) і є ключовим фактором патогенезу ХМЛ. Особливу увагу було зосереджено на молекулярних механізмах, які можуть сприяти залученню FBP17 до клітинних процесів, що активуються BCR-ABL, зокрема, ремоделюванню актинового цитоскелету, клітинній міграції, ендоцитозу та формуванню інвазивного фенотипу. На основі літературного аналізу встановлено, що BCR-ABL, особливо у p210-ізоформі, локалізується у цитоплазмі, асоціюється з цитоскелетом і активує сигнальні шляхи, пов'язані з Rac1, Cdc42, PI3K та іншими ефекторами. PH-домен BCR у цій ізоформі взаємодіє з фосфоінозитидними компонентами мембрани, що сприяє формуванню сигнальних платформ. FBP17 є адаптерним білком із F-BAR-доменом, здатним індукувати мембранну кривизну, та SH3-доменом, через який він взаємодіє з білками полімеризації актину (зокрема N-WASP, Acp2/3). У нормі та при патологіях він локалізується у ділянках активної мембранної динаміки — інвадоподіях, подосомах, ендоцитозних структурах. У багатьох пухлинних клітинах відмічається підвищена експресія FBP17, що корелює з посиленою інвазією та метастазуванням.

З метою перевірки гіпотези щодо взаємодії PH-домену BCR із FBP17 було створено експресійну конструкцію pGEX4T1-FBP17 для продукування рекомбінантного білка з GST-тегом. Його експресію здійснено в системі *E. coli*, після чого білок був очищений за допомогою афінної хроматографії на глутатіон-сефарозі. PH-домен BCR експресували окремо з His-тегом і очищували на Ni-NTA смолі. Обидва білки проявили очікувані фізико-хімічні характеристики — відповідну молекулярну масу, розчинність та стабільність.

Під час GST-пулдауну встановлено, що PH-домен специфічно зв'язується з іммобілізованим GST-FBP17, про що свідчила наявність

характерного сигналу на вестерн-блоті з використанням анти-Nis антитіл. У негативному контролі, де використовували лише GST, сигнал не виявлявся. Це демонструє наявність специфічної фізичної взаємодії між досліджуваними білками. Отримані результати узгоджуються з літературними даними щодо ролі обох білків у процесах ремоделювання цитоскелету, клітинної полярності та міграції. Враховуючи, що BCR-ABL активує Rho-сімейство малих ГТФаз, а FBP17 є ефектором Cdc42, їхня кооперація у сигнальних шляхах, що регулюють клітинний рух і пластичність, виглядає цілком обґрунтованою.

Встановлена взаємодія між PH-доменом BCR та FBP17 відкриває нові перспективи для глибшого розуміння молекулярних механізмів інвазивності лейкоцичних клітин. З огляду на те, що FBP17 експресується в гемопоетичних клітинах і бере участь у формуванні інвазивних структур, його асоціація з BCR-ABL може мати важливе функціональне значення у прогресії ХМЛ та розвитку терапевтичної резистентності.

ВИСНОВКИ

1. Успішно вбудовано ген FBP17 у вектор для бактеріальної експресії та отримано конструкцію, придатну для трансформації бактерій та експресії рекомбінантного білка FBP17.
2. Успішно напрацьовано та очищено за допомогою афінної хроматографії рекомбінантний PH-домен білка VCR і повнорозмірний білок FBP17.
3. Проведено GST-пулдаун аналіз, який дозволив дослідити потенційну взаємодію між PH-доменом білка VCR та білком FBP17.
4. Вестерн-блотинг підтвердив наявність прямої взаємодії між досліджуваними білками.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:233–45. doi: 10.1038/nrc2091.
2. Peiris MN, Li F, Donoghue DJ. BCR: a promiscuous fusion partner in hematopoietic disorders. *Oncotarget*. 2019 Apr 12;10(28):2738-2754. doi: 10.18632/oncotarget.26837. PMID: 31105873; PMCID: PMC6505627.
3. Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res*. 2001 Mar 15;61(6):2343-55. PMID: 11289094.
4. Gregor T, Bosakova MK, Nita A, Abraham SP, Fafilek B, Cernohorsky NH, Rynes J, Foldynova-Trantirkova S, Zackova D, Mayer J, Trantirek L, Krejci P. Elucidation of protein interactions necessary for the maintenance of the BCR-ABL signaling complex. *Cell Mol Life Sci*. 2020 Oct;77(19):3885-3903. doi: 10.1007/s00018-019-03397-7. Epub 2019 Dec 9. PMID: 31820037; PMCID: PMC11104816.
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. *Experimental Cell Research*. 2010;316:530-542.
6. Stein A, Pache RA, Bernadó P, Pons M, Aloy P. Dynamic interactions of proteins in complex networks: a more structured view. *FEBS J*. 2009 Oct;276(19):5390-405. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07251.x. Epub 2009 Aug 27. PMID: 19712106.
7. Suman P, Mishra S, Chander H. High formin binding protein 17 (FBP17) expression indicates poor differentiation and invasiveness of ductal carcinomas. *Sci Rep*. 2020 Jul 14;10(1):11543. doi: 10.1038/s41598-020-68454-9. PMID: 32665637; PMCID: PMC7360568.

8. Zhou T, Medeiros LJ, Hu S. Chronic Myeloid Leukemia: Beyond BCR-ABL1. *Curr Hematol Malig Rep*. 2018;13:435–45. doi: 10.1007/s11899-018-0474-6.
9. Gesbert F, Griffin JD. Bcr/Abl Activates Transcription of the Bcl-X Gene through STAT5. *Blood*. 2000;96:2269–76. doi: 10.1182/blood.V96.6.2269.
10. Wang Y, Miller AL, Mooseker MS, et al. The abl-related gene (arg) nonreceptor tyrosine kinase uses two F-actin-binding domains to bundle F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:14865–70. doi: 10.1073/pnas.251249298.
11. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*. 1996;88:2375–84.
12. Montenegro-Garraud X, Miranda RN, Reynolds A, Tang G, Wang SA, Yabe M, Wang W, Fang L, Bueso-Ramos CE, Lin P, Medeiros LJ, Lu X. Myeloproliferative neoplasms with t(8;22)(p11.2;q11.2)/BCR-FGFR1: a meta-analysis of 20 cases shows cytogenetic progression with B-lymphoid blast phase. *Hum Pathol*. 2017;65:147–56. doi: 10.1016/j.humpath.2017.05.008.
13. Kazlauskas A. PDGFs and their receptors. *Gene*. 2017;614:1–7. doi: 10.1016/j.gene.2017.03.003.
14. Yigit N, Wu WW, Subramaniam S, Mathew S, Geyer JT. BCR-PDGFR A fusion in a T lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Cancer Genet*. 2015;208:404–7. doi: 10.1016/j.cancergen.2015.04.007.
15. Ibanez CF. Structure and physiology of the RET receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5. doi: 10.1101/cshperspect.a009134.
16. Griesinger F, Hennig H, Hillmer F, Podleschny M, Steffens R, Pies A, Wormann B, Haase D, Bohlander SK. A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11.2) translocation in a patient with a clinically typical chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;44:329–33. doi: 10.1002/gcc.20235.
17. Cirmena G, Aliano S, Fugazza G, Bruzzone R, Garuti A, Bocciardi R, Bacigalupo A, Ravazzolo R, Ballestrero A, Sessarego M. A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11) in a patient with acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;183:105–8. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2008.02.005.

18. 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 U S A*. 1995;92:10282–6. doi: 10.1073/pnas.92.22.10282.
19. Sahay S, et al. The RhoGEF domain of p210 Bcr-Abl activates RhoA and is required for transformation. *Oncogene*. 2007;27:2064–71. doi: 10.1038/sj.onc.1210841.
20. Griesinger F, Hennig H, Hillmer F, Podleschny M, Steffens R, Pies A, Wormann B, Haase D, Bohlander SK. A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11.2) translocation in a patient with a clinically typical chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;44:329–33. doi: 10.1002/gcc.20235.
21. Cirmena G, Aliano S, Fugazza G, Bruzzzone R, Garuti A, Bocciardi R, Bacigalupo A, Ravazzolo R, Ballestrero A, Sessarego M. A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11) in a patient with acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;183:105–8. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2008.02.005.
22. Bracco E, Shahzad Ali M, Magnati S, Saglio G. The Paradigm of Targeting an Oncogenic Tyrosine Kinase: Lesson from BCR-ABL [Internet]. *Advances in Precision Medicine Oncology*. IntechOpen; 2021. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.97528>
23. Zheng R, Wei W, Liu S, Zeng D, Yang Z, Tang J, Tan J, Huang Z, Gao M. The FABD domain is critical for the oncogenicity of BCR/ABL in chronic myeloid leukaemia. *Cell Commun Signal*. 2024 Jun 7;22(1):314. doi: 10.1186/s12964-024-01694-8. PMID: 38849885; PMCID: PMC11157785.
24. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1619-30. doi: 10.1182/blood-2008-03-144790. Epub 2008 Sep 30. PMID: 18827185; PMCID: PMC3952549.
25. Amarante-Mendes GP, Rana A, Datoguia TS, Hamerschlak N, Brumatti G. BCR-ABL1 Tyrosine Kinase Complex Signaling Transduction: Challenges to Overcome Resistance in Chronic Myeloid Leukemia. *Pharmaceutics*.

2022 Jan 17;14(1):215. doi: 10.3390/pharmaceutics14010215. PMID: 35057108; PMCID: PMC8780254.

26. Allosteric regulation of autoinhibition and activation of c-Abl Liu, Yonglan et al. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, Volume 20, 4257 – 4270.

27. Liu Y, Jang H, Zhang M, Tsai CJ, Maloney R, Nussinov R. The structural basis of BCR-ABL recruitment of GRB2 in chronic myelogenous leukemia. *Biophys J*. 2022 Jun 21;121(12):2251-2265. doi: 10.1016/j.bpj.2022.05.030. Epub 2022 May 31. PMID: 35651316; PMCID: PMC9279350.

28. Zhou T, Medeiros LJ, Hu S. Chronic Myeloid Leukemia: Beyond BCR-ABL1. *Curr Hematol Malig Rep*. 2018;13:435–45. doi: 10.1007/s11899-018-0474-6.

29. Gesbert F., Griffin J.D. Bcr/Abl Activates Transcription of the Bcl-X Gene through STAT5. *Blood*. 2000;96:2269–2276. doi: 10.1182/blood.V96.6.2269.

30. Wang Y, Miller AL, Mooseker MS, et al. The abl-related gene (arg) nonreceptor tyrosine kinase uses two F-actin-binding domains to bundle F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:14865–70. doi: 10.1073/pnas.251249298.

31. Renshaw MW, Moelling K. Bcr is a negative regulator of the Wnt signalling pathway. *EMBO Rep*. 2005 Nov;6(11):1095-100. doi: 10.1038/sj.embor.7400536. Epub 2005 Oct 7. PMID: 16211085; PMCID: PMC1371031.

32. Deininger, M. W. N., & Druker, B. J. (2008). Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Hematology 2008, the American Society of Hematology Education Program Book*, 2008(1), 436–442. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2008.1.436>

33. Ma, L., Shan, Y., Bai, R., Xue, L., Eide, C. A., Sullivan, C. T., ... & Druker, B. J. (2016). A therapeutically targetable mechanism of BCR-ABL-independent resistance in chronic myeloid leukemia. *Cancer Communications*, 36, Article 23. <https://doi.org/10.1186/s40880-016-0108-0>

34. National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2004). *Chronic Myelogenous Leukemia*. In: Kufe, D. W., Pollock, R. E., Weichselbaum, R. R., et al. (Eds.), *Holland-Frei Cancer Medicine* (6th ed.). Hamilton (ON): BC Decker. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6529/>

35. OncoHEMAKey. (n.d.). *Chronic Myeloid Leukemia*. In: *OncoHEMAKey.com*. Retrieved June 2, 2025, from <https://oncohemakey.com/chronic-myeloid-leukemia-5/>

36. 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 U S A*. 1995;92:10282–6. doi: 10.1073/pnas.92.22.10282.

37. Lin, H., Li, W., Sun, Y., Jiang, C., Xu, J., Zhang, J., ... & Qian, W. (2017). BCR–ABL1 fusion protein: A potential target of natural products in chronic myeloid leukemia. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 800. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00800>

38. Sahay S, et al. The RhoGEF domain of p210 Bcr-Abl activates RhoA and is required for transformation. *Oncogene*. 2007;27:2064–2071. doi: 10.1038/sj.onc.1210841

39. Yamada, T., Park, C. S., Mamonkin, M., & Lacorazza, H. D. (2017). Transcription factor ELF4 controls proliferation and homing of hematopoietic stem cells and leukemia-initiating cells in MLL-AF9–induced AML. *Leukemia*, 31(10), 2229–2237. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.89>
(Повний текст: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5667957/>)

40. Melo, J. V., & Barnes, D. J. (2007). Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(6), 441–453. <https://doi.org/10.1038/nrc2147>
(Повний текст: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2889966/>)

41. Di Cola, A., Maestri, M., & Vannini, M. (2012). Protein translocation across biological membranes. *Membranes*, 2(1), 91–107. <https://doi.org/10.3390/membranes2010091>

42. Itoh, R. E., Kurokawa, K., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Mochizuki, N., & Matsuda, M. (2005). Activation of Rac and Cdc42 video imaged by FRET-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Journal of Cell Biology*, *168*(2), 239–245. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508091>
(Доповнення: <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200508091/DC1>)
43. Smith, K. M., Yacobi, R., & Van Etten, R. A. (2003). Autoinhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase by its SH3 domain. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(7), 2285–2294. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.7.2285-2294.2003>
(Повний текст: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2063556/>)
44. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. (n.d.). *FNBP1 (formin binding protein 17)*. Retrieved June 2, 2025, from <https://atlasgeneticsoncology.org/gene/353/fnbp1-%28formin-binding-protein-17%29>
45. Bu, W., Chou, A. M., Lim, K. B., Sudhakaran, T., & Ahmed, S. (2007). The Toca-1–N-WASP complex links filopodial formation to endocytosis. *Cell*, *129*(4), 857–868. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.041>
46. Guerrier, S., Coutinho-Budd, J., Sassa, T., Gresset, A., Jordan, N. V., Chen, K., ... & Polleux, F. (2009). The F-BAR domain of srGAP2 induces membrane protrusions required for neuronal migration and morphogenesis. *Cell*, *138*(5), 990–1004. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.047>
(Повний текст: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7360568/>)
47. Smith, K. M., Yacobi, R., & Van Etten, R. A. (2003). Autoinhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase by its SH3 domain. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(7), 2285–2294. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.7.2285-2294.2003>
(Повний текст: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2063556/>)
48. Suetsugu, S., Toyooka, K., & Senju, Y. (2023). Function and structure of F-BAR domain proteins in membrane curvature generation. *Journal of Cell Science*, *136*(15), jcs259378. <https://doi.org/10.1242/jcs.259378>
(Повний текст: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11527352/>)

49. Tsujita, K., Takenawa, T., & Itoh, T. (2019). Feedback regulation between plasma membrane tension and membrane-bending proteins organizes cell polarity during leading edge formation. *Life Science Alliance*, 2(3), e201800288. <https://doi.org/10.26508/lsa.201800288>
50. Renard, H.-F., Simunovic, M., Lemiere, J., Boucrot, E., Garcia-Castillo, M. D., Arumugam, S., ... & Johannes, L. (2023). Endophilin-A2 regulates actin-driven scission of endocytic carriers in clathrin-independent endocytosis. *Cells*, 12(19), 1964. <https://doi.org/10.3390/cells12101964> (Повний текст: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10417648/>)
51. Sigma-Aldrich. (n.d.). *pGEX vectors – cloning and expression*. Retrieved June 2, 2025, from <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/technical-documents/protocol/genomics/cloning-and-expression/pgex-vectors>
52. New England Biolabs. (2020). *T7 Express Competent E. coli Transformation Protocol*. protocols.io. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.gtcbbwiw>
53. Froger, A., & Hall, J. E. (2007). Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of Visualized Experiments*, (6), 253. <https://doi.org/10.3791/253>
54. Crowley, P. D. (2020). *GST Pull-Down Assay to Study Protein–Protein Interactions*. protocols.io. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.gtbbwin>
55. Affinity chromatography. (n.d.). Retrieved June 2, 2025, from https://www.researchgate.net/publication/358125891_Protein_Purification_by_Affinity_Chromatography & Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., & Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258(5536), 598–599. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26096507/>
56. Heroux, A. (2020). *GST Bead Pulldown Assay*. protocols.io. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.kqdg3pdrpl25/v1>
57. Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and*

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3456489/>

58. Addgene. (n.d.). *Plasmid #27688: mCherry-FBP17*. Retrieved June 2, 2025, from <https://www.addgene.org/27688/>

59. Addgene. (n.d.). *Vector database entry: pGEX-4T-1*. Retrieved June 2, 2025, from <https://www.addgene.org/vector-database/2876/>

60. ResearchGate. (n.d.). *Figura 10: Vector de expresión pGEX-4Ta*. Retrieved June 2, 2025, from https://www.researchgate.net/figure/Figura-10-Vector-de-expresion-pGEX-4Ta-Vector-de-expresion-usado-para-la_fig4_321071494

61. Addgene. (n.d.). *Plasmid #27688: mCherry-FBP17*. Retrieved June 2, 2025, from <https://www.addgene.org/27688/>

62. GeneCards. (n.d.). *FNBP1 Gene – Formin Binding Protein 1*. Retrieved June 2, 2025, from <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FNBP1>

63. Гур'янов Д.С., Кравчук І.В., Антоненко С.В., Теслюк М.Г., Дибков М.В., ТелегєєвГ.Д. Окремі функції РН домену р210 ізоформи BCR/ABL: взаємодія з білками ремоделювання цитоскелету та мембран // *Цитологія и генетика*. – 2025. – Т. 59, № 2. – С. 31–43. – URL: <https://www.cytgen.com/uk/2025/31-43N2V59.htm>