

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20 ____ р.

**ЕКСПРЕСІЯ ГЕНА *CR16*, СИНТЕЗ ТА ВЗАЄМОДІЇ *CR16*
З ПРОТЕЇНАМИ-ПАРТНЕРАМИ**

Кваліфікаційна робота бакалавра

денної форми навчання

за спеціальністю

Біотехнології та біоінженерія

Піменова Олександра Сергійовича

Науковий керівник від кафедри

канд. біол. наук, доц. Юет А.С.

Робота виконана у відділі функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України під керівництвом ст. наук. співроб. відділу, канд. біол. наук, ст. наук. співроб. Кропивка Сергія Вікторовича

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДСН	– додецилсульфат натрію;
ПААГ	– поліакриламідний гель;
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція;
трис	– трис(гідроксиметил)амінометан;
Arp2/3	– actin related protein 2/3 complex (комплекс актиноспоріднених білків 2/3);
GST	– Glutathione S-transferase (глутатіон-S-трансфераза);
SH3	– Src homology 3 (Домен SRC Homology 3);
SH2	– Src homology 2 (Домен SRC Homology 2);
PX	– Phox-гомологія;
TKS4	– tyrosine kinase substrate with 4 SH3 domains (тирозинкіназний субстрат з 4 SH3-доменами);
WASP	– wiskott-aldrich syndrome protein (білок синдрому Віскотта-Олдріча);
GRB2	– Growth factor receptor-bound protein 2 (рецепторний білок фактор росту 2);
DMEM	– Dulbecco's modified eagle medium (модифіковане середовище Ігла Дульбекко).

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. Сучасні уявлення про CR16 та його значення для клітинної динаміки.....	7
1.1. Білки-адаптери та їхня роль в клітинних процесах.....	7
1.2. Структура та функції білка CR16.....	10
1.3. Взаємодія CR16 з білками-партнерами.....	15
1.4. Експресія <i>CR16</i> у клітинах різного походження.....	19
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	23
2.1. Матеріали та реактиви.....	23
2.2. Культури клітин та біологічний матеріал.....	24
2.3. Культивування культур клітин.....	24
2.4. Виділення тотальної РНК з клітинних ліній.....	25
2.5. Очищення препаратів тотальної РНК від геномної ДНК.....	25
2.6. Синтез кДНК на препараті тотальної РНК.....	26
2.7. Кількісна ПЛР в реальному часі з використанням Taq-Man зондів.....	26
2.8. Обчислення результатів кількісної ПЛР у реальному часі.....	27
2.9. Проведення GST Pull-Down аналізу білок-білкових взаємодій.....	28
2.10. Диск-електрофорез в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію за методикою Леммлі	29
2.11. Вестерн-блот аналіз.....	29
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення.....	31
3.1. Аналіз експресії <i>CR16</i> у панелі клітин людини.....	31
3.2. Синтез CR16 у клітинних лініях людини різного походження.....	34
3.3. Ідентифікації протеїнів-партнерів CR16.....	38
ВИСНОВКИ.....	42

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	43
--	-----------

ВСТУП

Регуляція клітинних процесів у людини значною мірою залежить від роботи білків-адаптерів, які координують взаємодію між сигнальними шляхами, цитоскелетними структурами та механізмами клітинної відповіді на зовнішні стимули. Одним із таких білків є CR16 (Cytokine-Responsive protein 16) – малодосліджений, але перспективний регулятор, що привертає увагу завдяки своїй участі у формуванні актинових структур, міжбілкових комплексів та потенційній ролі у патологічних процесах [1].

CR16 був ідентифікований як білок, чутливий до дії цитокінів, однак подальші дослідження показали, що його функціональна активність значно ширша. Зокрема, CR16 взаємодіє з низкою білків, залучених до регуляції актинового цитоскелету, включно з представниками родини WASP (wiskott-aldrich syndrome protein (білок синдрому Віскотта-Олдріча)), білками з SH3-доменною організацією та іншими адаптерами, що беруть участь у формуванні клітинних протрузій, міграції та адгезії [2, 3]. Незважаючи на це, дані про експресію CR16 у клітинах людини різного походження, його ізоформи, регуляцію та функціональні наслідки взаємодії з партнерами залишаються фрагментарними.

Актуальність дослідження CR16 зумовлена кількома ключовими аспектами. По-перше, білки, що регулюють актиновий цитоскелет, відіграють критичну роль у розвитку широкого спектра патологій – від імунних порушень до нейродегенеративних захворювань та раку [2]. Будь-які зміни у функціонуванні таких білків можуть призводити до порушення клітинної морфології, міграції, інвазивності та міжклітинної взаємодії.

По-друге, CR16 потенційно може бути залучений у сигнальні шляхи, що регулюють клітинну відповідь на зовнішні стимули, включаючи цитокіни, фактори росту та стресові сигнали [1]. Це робить його перспективним

кандидатом для вивчення у контексті запальних процесів, імунної відповіді та пухлинної трансформації. По-третє, на сьогодні відсутні систематичні дослідження, які б порівнювали рівень експресії CR16 у клітинах різного походження – епітеліальних, мезенхімальних, імунних, пухлинних. Такий аналіз дозволив би з'ясувати, чи є CR16 універсальним регулятором, чи його функції залежать від типу тканини та клітинного мікрооточення [2].

Окремий інтерес становить вивчення взаємодій CR16 з білками-партнерами. Відомо, що CR16 містить домени, здатні до білок-білкових взаємодій, зокрема з факторами, що регулюють полімеризацію актину [4]. Це дозволяє припустити, що CR16 може виступати скафолдним елементом у формуванні сигнальних комплексів, які координують перебудову цитоскелету. Дослідження таких взаємодій є важливим кроком до розуміння того, як клітини змінюють свою морфологію, рухливість та інвазивність у відповідь на зовнішні стимули.

Вивчення CR16 також може мати прикладне значення. У багатьох типах раку саме порушення регуляції актинового цитоскелету та міжбілкових комплексів сприяє метастазуванню, інвазії та формуванню інвадоподій [1]. Якщо CR16 виявиться залученим у ці процеси, він може стати перспективною мішенню для терапевтичного впливу або біомаркером агресивності пухлин. Крім того, аналіз експресії CR16 у нормальних та трансформованих клітинах може допомогти зрозуміти, чи є його функції специфічними для певних тканин або універсальними.

З огляду на вищезазначене, метою роботи було проаналізувати експресію CR16, синтез та взаємодії CR16 з протеїнами-партнерами.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

1. Визначити рівень експресії CR16 у панелі клітин людини.
2. Оцінити синтез CR16 у клітинних лініях людини різного походження.
3. Ідентифікувати білки-партнери CR16.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО CR16 ТА ЙОГО ЗНАЧЕННЯ ДЛЯ КЛІТИННОЇ ДИНАМІКИ

1.1. Білки-адаптери та їхня роль у клітинних процесах

Білки-адаптери є фундаментальними регуляторами клітинних процесів, які забезпечують інтеграцію та координацію сигналів у складних внутрішньоклітинних мережах. Вони не мають власної каталізуючої активності, проте їхня здатність одночасно зв'язувати кілька білків робить їх незамінними у формуванні багатокomпонентних сигнальних комплексів. Завдяки цьому адаптери виступають у ролі молекулярних платформ, які координують взаємодію між рецепторами, ферментами та структурними білками, забезпечуючи точність і швидкість клітинних реакцій [5]. Їхня функціональна універсальність дозволяє клітині швидко реагувати на зовнішні стимули, координувати внутрішньоклітинні процеси та підтримувати цілісність сигнальних шляхів [6].

Структурна організація білків-адаптерів визначає їхню функціональну універсальність. Найчастіше вони містять модульні домени, такі як SH2, SH3, PH, PX та пролін-збагачені мотиви [7], що забезпечують специфічність міжбілкових взаємодій (рис. 1.1). SH2-домени розпізнають фосфотирозинові залишки, що дозволяє адаптерам інтегрувати сигнали від рецепторних тирозинкіназ [8].

SH3-домени взаємодіють із пролін-збагаченими ділянками білків-мішеней, що є критично важливим для регуляції актинової полімеризації [10]. PH-домени забезпечують взаємодію з фосфоінозитидами мембрани, визначаючи локалізацію адаптерів у клітині та їхню участь у мембранних процесах [1].

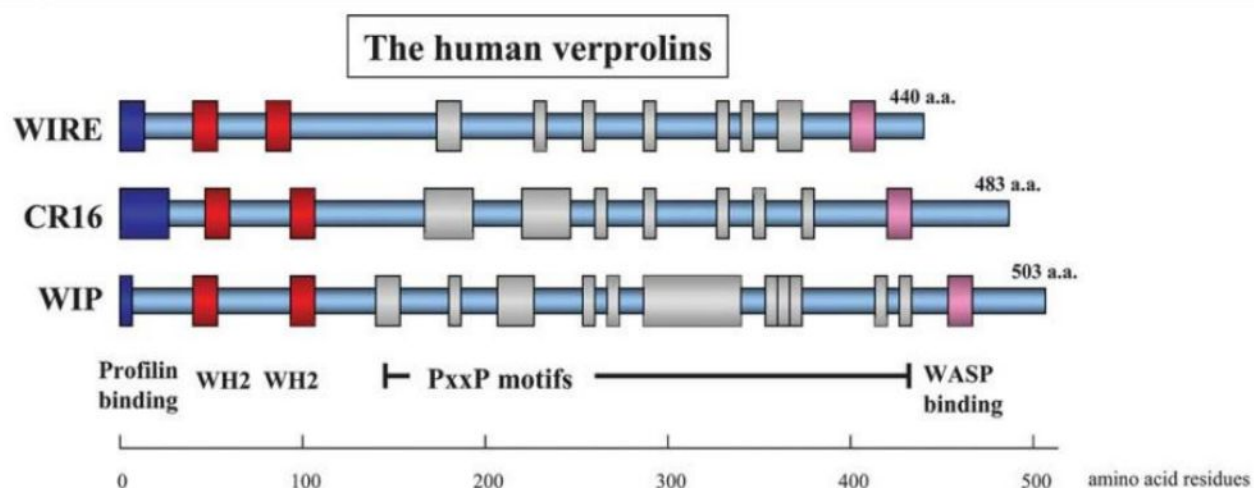


Рис. 1.1. Схематичне зображення родини верпролінів людини WIRE, CR16 та WIP. Пояснення в тексті. Запозичено з [9]

Завдяки такій модульності адаптери здатні формувати динамічні сигнальні комплекси [11], які інтегрують сигнали від різних рецепторів та координують клітинні відповіді (рис. 1.2).

Функціональна роль адаптерів у клітинній сигналізації полягає у передачі сигналів від рецепторів до внутрішньоклітинних ефекторів, стабілізації білків-партнерів, інтеграції сигналів від різних рецепторів та регуляції цитоскелетних перебудов. Класичним прикладом є GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2 (рецепторний білок фактор росту 2), який зв'язує активований рецептор епідермального фактору росту (EGF) та рекрутує SOS, активуючи Ras-MAPK каскад [12]. Інші адаптери, такі як WIP, стабілізують WASP, захищаючи його від протеасомної деградації, що є критично важливим для підтримання активності WASP-родини [13]. Таким чином, адаптери виступають не лише як «мостики» між білками, але й як регулятори їхньої стабільності та функціональної активності.

Особливе значення адаптери мають у регуляції актинового цитоскелету. Актиновий цитоскелет є основою клітинної морфології, міграції, адгезії та внутрішньоклітинного транспорту. Його динаміка контролюється складною мережею білків, серед яких ключову роль відіграють WASP-родина,

Arp2/3-комплекс, профілін, кофілін та численні адаптери [14].

		Profilin-binding motif	WH2 motif 1	
WIRE	1	MFIFPPPPPP-----PPGPPPPPTTHQANTEQKLSRDEQR	SGALLQDSCKTKKKV	53
WIP	1	MFVPPPPPP-----APPPPPPTFALANTEKETINKTEQAN	SNALLSDSKKKKKKT	49
CR16	1	MFVPPPPPPPLPPPPPPPLPAPPPPPPPGPPISIDAESIRKSDLK	SSSLADQQQTRRRV	62
			WH2 motif 2	
WIRE	54	TNINDRSAPILEKPK-----GSSGGYCSG-----	GAALHPKGLQCGVVK	94
WIP	50	VTN-DRSAPILDKPKGAGAGGGGGGFGGGFGGGGGGGGGGSG	GGGPPGLGLQAMMK	110
CR16	63	TCINDRSAPQIESK-----GTNKEGSG-----	ANTRGASTPPTLADNAGGEV	108
WIRE	95	RPVGAKEGSENLAGK-EALQIESR-----AAAFRPEVSAASGR	PQDDTDSSRASLPETPR	150
WIP	111	STANRA-NDSGGSR-PPLLPFGGRS---TSAKFSPPSGF-GFPVPS	PGHRSGPPEPQR	166
CR16	109	PAGQRTVAGGKTGQGGSRAPSPRLPNKTISGELIPEASP-	SLGNTSEAHGAARTAPPR	168
WIRE	151	MQRS-LDLS-REN-----TTSSTGMKHSAP-----P	PPPPGRANAP-PTPLMHSSKAP	201
WIP	167	NRMPPRDVGSKEDSI PPPVPSTPRPIOSSLHNRGSPFVPGGP	QPSPGPTPPPEPGRGT	228
CR16	169	PNVGAPPPTPPPP-----PPLPPLPSSSPKKTPLVSP	PGPLTKGNL-VVAPPVCPAPP	225
WIRE	202	AYN-----REK-----PTPEPTGQRHPGREGPTAPPVVK	-----PPPSFV	237
WIP	229	ALGGGSIRQSPPLSSSSPFSNRPPPTSRALD--DKPPEPPP	VGNRPSIHREAVPPPEPQ	288
CR16	226	PPP-----PPP-----PTPEPLPASVLSKAVKCOLAHLHLP	-----IPPEL	266
WIRE	238	NIRTGPSQSLAP-----PPPEYRQ-PEGVNGFSSPTNESAP	ELPQRHNSLHRKTP-	288
WIP	289	NNKP-PVSTPRPSAPHRPHLRPPPSRPGPPPLF--PSSGND	ETRLPQNLSSSTEP	347
CR16	267	LPPCGYPGLKAEASPAQDAQEPAP-----PEPLPYASCSPRASL	APPLPGVNSSTETP	324
WIRE	289	-GFVRG-LAPPPPTASPSLLSNRPPPPARDPFSRGAAPPPPPVIRN	--ARDAPPPPEPY	346
WIP	348	-LSPGRSGPLPPPP-----SEREPPEVRDPGRSGPLPPPPVSRN	GTSRALPATPOLP	402
CR16	325	PLPKSPSPQAPPQK---AGAALEAPPA--PG-SQPELQKKRHG	PPAGGKLNPEAP	380
WIRE	347	RMHGSEPPSRG-KPPPPPSRTAGPEPPPPPP--PLRNGHRDSIT	TVRSFLDFESKYS	405
WIP	403	SRSGVDSRSGRPPLPPDRPSAGAPPPPPPTSLRNGFQDSP----	CELEWESRFP	459
CR16	381	ARSETTELSSK-----S-QQATWTETQQEGG-QLRNGLHII	-----DL-FESKFT	428
		WASP binding motif		
WIRE	406	EETAEKHFQRI-----TN-----RAAGAPPLPPIIR		440
WIP	460	SLAPPEPVQTKSGLLARN-----ESRSGSNRRERGPPLPPIR		503
CR16	429	EETPEDEKPCQKI-----IPSRTPGPWLQAEAVQSSDDIKGNS	QLSLKTLR	483

Рис. 1.2. Вирівнювання амінокислотних послідовностей усіх людських верпролінів: позиція потенційного мотиву зв'язування з профіліном виділена синім кольором, позиції доменів WH2 – червоним, а мотив зв'язування з WASP – рожевим. Запозичено з [9]

WASP та N-WASP активують Arp2/3-комплекс, який ініціює формування розгалужених актинових структур, необхідних для формування ламеліподій та філоподій. Проте їхня активність суворо контролюється адаптером WIP, що зв'язує WASP і стабілізує його, або CR16 (WIPF3), який взаємодіє з N-WASP і регулює його локалізацію та функціональну активність [15].

CR16 був ідентифікований як білок, що взаємодіє з N-WASP у нейронах, локалізується у філоподіях та бере участь у формуванні ростових конусів. Показано, що CR16 експресується переважно у мозку та формує комплекс з N-WASP, що підтверджує його роль у регуляції актинової полімеризації [16].

Структурний аналіз CR16 показав наявність пролін-збагачених мотивів, які забезпечують зв'язування з SH3-доменною білками, а також мотивів, що дозволяють взаємодіяти з актином. Це робить CR16 важливим адаптером у регуляції цитоскелетних перебудов, а також перспективним об'єктом для дослідження у контексті клітинної міграції, нейронального розвитку та імунної регуляції [17].

У клітинній міграції адаптери відіграють ключову роль, оскільки вони координують формування ламеліподій та філоподій, утворення фокальних адгезій, скорочення актоміозину та від'єднання заднього краю клітини. N-WASP активується у відповідь на Cdc42, але потребує участі CR16 та WIP, які забезпечують його стабільність та правильну локалізацію [18]. У пухлинних клітинах адаптери можуть сприяти інвазивності, оскільки вони беруть участь у формуванні інвадоподій – спеціалізованих протрузій, що руйнують позаклітинний матрикс і забезпечують інвазивність пухлинних клітин [19].

Білки-адаптери є універсальними регуляторами клітинної динаміки, які забезпечують координацію численних процесів – від формування цитоскелетних структур до передачі сигналів та регуляції імунної відповіді. CR16 є одним із найменш досліджених представників цієї групи, проте наявні дані свідчать про його важливу роль у регуляції актинової полімеризації, взаємодії з WASP-родиною та участі у клітинній міграції [19]. Подальше вивчення CR16 може розширити уявлення про механізми регуляції цитоскелету та виявити нові аспекти клітинної поведінки у нормі та патології.

1.2. Структура та функції білка CR16

Білок CR16 (Cortactin-related protein of 16 kDa), також відомий як WIPF3 (WASP-interacting protein family member 3), належить до еволюційно

консервативної родини верпролін-подібних білків, які виконують ключову роль у регуляції актинового цитоскелета та пов'язаних із ним клітинних процесів. До цієї родини також входять білки WIP (WIPF1) та WICH/WIRE (WIPF2), що мають спільні структурні риси та механізми дії, проте відрізняються тканинною специфічністю та функціональною активністю. Представники родини верпролінів широко представлені серед еукаріотичних організмів, а їхня висока еволюційна консервативність свідчить про фундаментальне значення у забезпеченні клітинної морфогенези, ендоцитозу та динаміки актинового цитоскелета [9, 20].

Ген *WIPF3* або *CR16*, який кодує білок CR16, характеризується складною екзон-інтронною організацією та здатністю до альтернативного сплайсингу, що створює передумови для формування різних транскрипційних варіантів. Наявність альтернативних ізоформ є характерною рисою багатьох адаптерних білків, оскільки це дозволяє клітині регулювати їх функціональну активність залежно від типу тканини та фізіологічного стану [20]. Генетичні дослідження показали, що несинонімічні варіанти *WIPF3* можуть бути асоційовані з патологічними станами, зокрема з розвитком абдомінальної аневризми аорти, що вказує на важливість цього білка для підтримання структурної стабільності клітин та тканин [21].

CR16 є типовим адаптерним білком, який не має власної ферментативної активності, проте забезпечує формування сигнальних платформ шляхом взаємодії з іншими білками. Однією з головних структурних особливостей CR16 є наявність пролін-збагачених ділянок (рис. 1.3). Такі ділянки є характерними для білків, що взаємодіють із SH3-доменами сигнальних молекул. Було показано, що CR16 здатний ефективно зв'язувати SH3-домени та є субстратом MAP-кіназ, що свідчить про його залучення до внутрішньоклітинних сигнальних каскадів. Взаємодії через SH3-домени є важливими для просторової організації сигнальних комплексів та передачі сигналів від мембранних рецепторів до цитоскелетних структур [22].

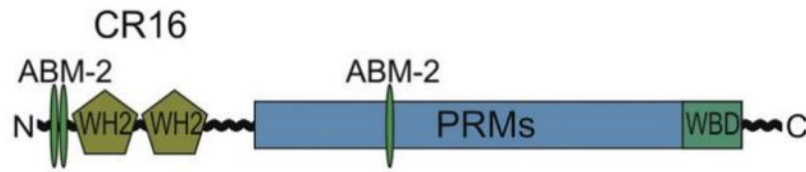


Рис. 1.3. Схематичне зображення структури людського CR16: N – кінцевий кінець білка (початок поліпептидного ланцюга), C – C-кінцевий кінець білка (кінець поліпептидного ланцюга), ABM-2 – Actin Binding Motif-2, (актин-зв’язувальний мотив 2-го типу), WH2 – WASP Homology 2 domain (домен гомології WASP 2), PRMs – Proline-Rich Motifs (пролін-збагачені мотиви), WBD – WASP Binding Domain (домен зв’язування з білками родини WASP). Запозичено з [23]

Крім пролін-збагачених регіонів, CR16 містить функціональні мотиви, пов’язані з регуляцією актину. У структурі білка присутні актин-зв’язувальні елементи, які дозволяють йому безпосередньо або опосередковано взаємодіяти з компонентами актинового цитоскелета. Експериментальні дослідження показали, що актин-зв’язувальний мотив CR16 та його пролін-багаті ділянки можуть виконувати функціонально надлишкові ролі. Навіть при порушенні одного з цих структурних компонентів клітина частково зберігає здатність до росту та підтримання цитоскелетної організації [24]. Це свідчить про високу функціональну пластичність білка (рис. 1.4).

Особливе значення для функціонування CR16 має його здатність взаємодіяти з білками родини WASP. У структурі CR16 містяться специфічні мотиви, які розпізнаються WH1/EVH1-доменами білків WASP та N-WASP [6]. Дослідження показали, що WH1-домен N-WASP специфічно взаємодіє з мотивами, присутніми у CR16, WIP та WICH, забезпечуючи формування стабільних сигнальних комплексів. Саме ця взаємодія лежить в основі регуляції полімеризації актину [25].

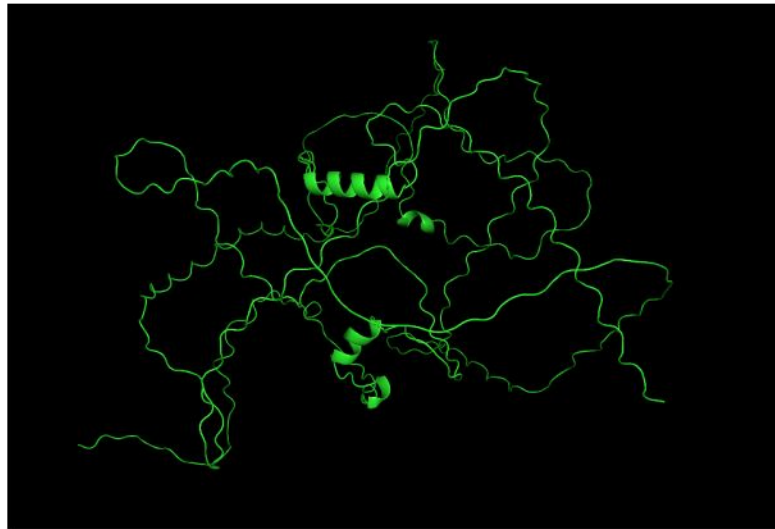


Рис. 1.4. Передбачена структура людського CR16 за допомогою «AlphaFold». Візуалізовано в програмі «PyMOL»

Однією з ключових функцій CR16 є формування комплексу з N-WASP. Було показано, що CR16 утворює стабільний комплекс з N-WASP у нейронах головного мозку. N-WASP є одним із головних активаторів Arp2/3-комплексу, центрального регулятора нуклеації актинових філаментів. Через взаємодію з N-WASP CR16 бере участь у контролі полімеризації актину та формуванні нових актинових структур. У клітині це має важливе значення для утворення ламеліподій, філоподій та інших мембранних протрузій, необхідних для клітинної міграції та міжклітинної взаємодії [1].

Подальші дослідження показали, що CR16 є компонентом складніших сигнальних комплексів, пов'язаних із регуляцією актинової динаміки. Зокрема, було встановлено, що білок Тоса-1 опосередковує Cdc42-залежну активацію комплексу N-WASP-WIP, у якому можуть брати участь і верпролінові білки, включаючи CR16. Через такі комплекси клітина координує сигнали від малих GTPаз родини Rho до механізмів ремоделювання цитоскелета [26].

CR16 також взаємодіє з білком Tuba, який містить BAR- та DH-домени та бере участь у регуляції активності малих GTPаз і мембранної динаміки. Встановлено, що Tuba формує комплекси з N-WASP, динаміном та CR16,

поєднуючи процеси ендоцитозу та організації актинового цитоскелета [27]. Такі взаємодії свідчать про важливу роль CR16 у просторовій координації сигнальних систем клітини.

Окрім цього, CR16 здатний взаємодіяти з іншими адаптерними білками, зокрема з ITSN (intersectin). Було показано, що CR16 модулює асоціацію ITSN-білків з актином, впливаючи на організацію цитоскелетних структур [23]. Також CR16 був ідентифікований як потенційний партнер TKS4 – адаптерного білка, який бере участь у формуванні подосом та регуляції клітинної інвазивності [28]. Участь CR16 у таких білкових комплексах вказує на його значення у процесах клітинної міграції, адгезії та ремоделювання мембрани.

Тканинна специфічність експресії CR16 свідчить про його функціональну спеціалізацію. Первинно CR16 був описаний як білок, що експресується у нейронах мозку, особливо у гіпокампі [22]. У нервовій тканині він бере участь у регуляції морфології нейронів та підтриманні синаптичної пластичності. Пізніше було встановлено, що CR16 експресується також у клітинах тестикул, де він утворює комплекс з N-WASP у клітинах Сертолі. Зниження експресії CR16 у цих клітинах асоціюється з порушенням сперматогенезу та розвитком азооспермії [2]. Важливість CR16 для репродуктивної функції підтверджується експериментами на мишах, де втрата цього білка призводила до чоловічої стерильності [29].

Крім нервової та репродуктивної систем, CR16 експресується у клітинах імунної системи. Було показано, що комплекси білків родини WASP та верпролінів, включаючи CR16, відіграють важливу роль у хемотаксисі моноцитів [30]. Регуляція актинового цитоскелета у цих клітинах є необхідною для забезпечення їхньої міграції у зону запалення та ефективної імунної відповіді.

Останні дослідження також виявили експресію WIPF3 у подоцитах нирок. Було показано, що CR16 може брати участь у підтриманні цитоскелетної

організації цих клітин та у процесах імуномодуляції [17]. Це свідчить про широку функціональну значущість білка у різних тканинах організму.

Експресія *CR16* регулюється під впливом різних зовнішніх факторів, зокрема гормонів та стресових сигналів. Ще у ранніх дослідженнях було показано, що рівень мРНК *CR16* у гіпокампі змінюється під дією глюкокортикоїдів та стресу [31]. Надалі було встановлено, що глюкокортикоїди регулюють експресію численних генів, пов'язаних із функціонуванням нервової системи та цитоскелетною динамікою [32]. Це дозволяє припустити, що *CR16* може бути важливим компонентом адаптаційної відповіді клітин на стресові фактори.

Таким чином, *CR16* є багатофункціональним адаптерним білком, структура якого визначає його участь у регуляції актинового цитоскелета та сигнальних процесів. Наявність пролін-збагачених мотивів, актин-зв'язувальних ділянок та сайтів взаємодії з WH1-доменами забезпечує здатність *CR16* формувати численні білкові комплекси. Через взаємодію з N-WASP, Toca-1, Tuba, ITSN та іншими білками *CR16* бере участь у контролі полімеризації актину, клітинної міграції, ендоцитозу та морфогенези. Його функціональна активність є важливою для нормального функціонування нервової, імунної та репродуктивної систем, а порушення експресії або структури білка може бути пов'язане з розвитком патологічних станів.

1.3. Взаємодія *CR16* з білками-партнерами

Функціональна роль білка *CR16* у клітині визначається його здатністю вступати у численні білок-білкові взаємодії, що формують складні сигнальні комплекси, відповідальні за регуляцію актинового цитоскелета. Як представник родини верпролінових білків, *CR16* виконує функцію адаптерної молекули, що забезпечує координацію між сигнальними білками та

ефекторами ремоделювання цитоскелета [9, 20]. Відсутність власної ферментативної активності компенсується здатністю зв'язувати широкий спектр білків-партнерів, що визначає його ключову роль у клітинній морфогенезі та міграції.

Найбільш важливою є взаємодія CR16 з білками родини WASP, зокрема з N-WASP, який є центральним регулятором полімеризації актину. Було показано, що CR16 формує стабільний комплекс з N-WASP у клітинах різного походження, включаючи нейрони та клітини тестикул [1, 2]. Ця взаємодія реалізується через зв'язування пролін-збагачених ділянок CR16 з WH1/EVH1-доменом N-WASP, що є характерним механізмом для білків родини верпролінів [25]. Завдяки цьому CR16 включається до складу сигнальних комплексів, що регулюють динаміку актину

Комплекс CR16-N-WASP відіграє ключову роль у регуляції полімеризації актину через активацію Arp2/3-комплексу. У неактивному стані N-WASP перебуває у автоінгібованій конформації, однак взаємодія з CR16 та іншими сигнальними молекулами, зокрема Cdc42, сприяє його активації та запуску процесів нуклеації актину [12, 26, 33]. Таким чином, CR16 виступає як позитивний регулятор актинового цитоскелета, забезпечуючи ефективну передачу сигналу до ефекторних білків.

Окрім N-WASP, CR16 здатний взаємодіяти з іншими представниками родини WASP, включаючи класичний WASP, що має важливе значення для функціонування клітин імунної системи. Комплекси WASP із верпроліновими білками забезпечують регуляцію хемотаксису та клітинної міграції, зокрема у моноцитах [30]. Це підкреслює участь CR16 у процесах імунної відповіді та міжклітинної взаємодії.

Взаємодія CR16 з білками родини WASP відбувається у контексті складних сигнальних каскадів, що включають малі GTPази. Зокрема, білок Тоса-1 виступає як ключовий посередник між активованим Cdc42 та N-WASP, формуючи разом із CR16 функціональний комплекс, що забезпечує активацію

актинової полімеризації [26]. У цьому комплексі CR16 відіграє роль стабілізуючого та організаційного компонента.

Додатково CR16 взаємодіє з іншими адаптерними білками, що розширює його функціональні можливості. Було показано, що CR16 може взаємодіяти з білком Tuba, який пов'язує сигнали мембранної динаміки з регуляцією актинового цитоскелета [27]. Крім того, CR16 модулює взаємодію білків родини ITSN з актином [23], впливаючи на формування сигнальних комплексів, пов'язаних із ендоцитозом, формуванням інвадоподій та філоподій (рис. 1.5).

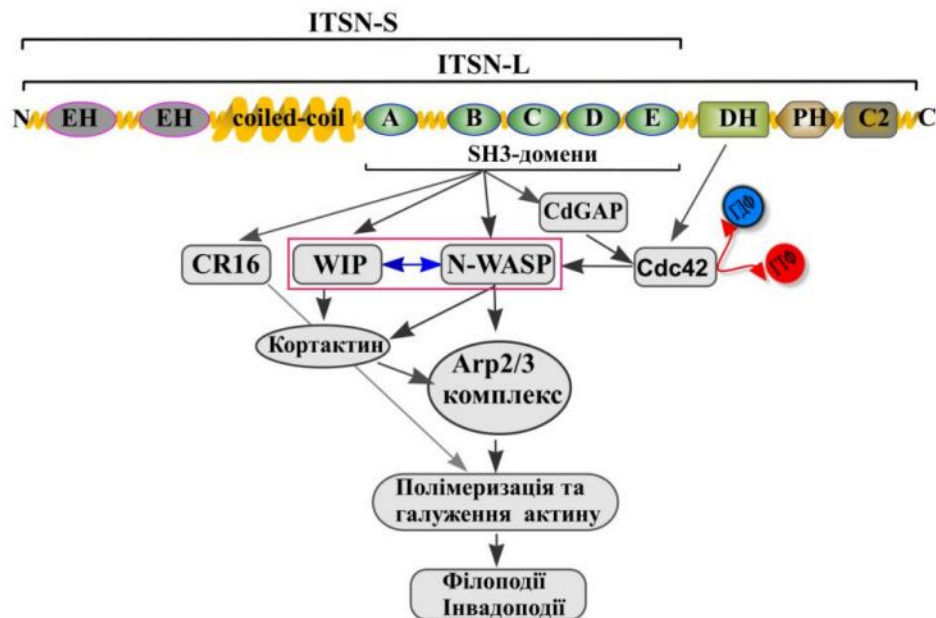


Рис. 1.5. Гіпотетична модель ITSN-залежного регулювання полімеризації актину за участі WIP та CR16. Пояснення в тексті. Запозичено з [34]

Іншим важливим партнером CR16 є білок TKS4, який бере участь у формуванні подосом і регуляції клітинної інвазивності [28]. Взаємодія CR16 з такими білками вказує на його можливу роль у процесах клітинної інвазії та ремоделювання позаклітинного матриксу.

CR16 бере участь у формуванні клітинних протрузій, таких як філоподії та ламеліподії. Ці структури утворюються внаслідок координованої

полімеризації актину та забезпечують рухливість клітини. Через взаємодію з N-WASP і активацію Arp2/3-комплексу CR16 сприяє формуванню розгалужених актинових мереж, характерних для ламеліподій, а також пучків актинових філаментів у філоподіях [9, 12, 35]. Локалізація CR16 у цих структурах підтверджує його безпосередню участь у клітинній морфогенезі.

Крім того, CR16 здатний безпосередньо взаємодіяти з актином, що дозволяє йому впливати на стабільність актинових філаментів. Було показано, що актин-зв'язувальні ділянки CR16 та його пролін-збагачені мотиви можуть виконувати частково надлишкові функції, забезпечуючи стабільність клітинного росту [24]. Така властивість є характерною для білків, що беруть участь у критично важливих клітинних процесах.

Сучасні протеомні підходи дозволяють значно розширити спектр відомих білків-партнерів CR16. Зокрема, використання методів мас-спектрометрії дає змогу аналізувати динаміку сигнальних комплексів і виявляти нові взаємодії адаптерних білків [36]. Дані біоінформатичних баз також свідчать про потенційну участь CR16 у широкій мережі білкових взаємодій, пов'язаних із регуляцією цитоскелета та клітинної сигналізації.

Отже, CR16 є важливим інтегратором сигнальних процесів, що регулюють динаміку актинового цитоскелета. Його взаємодія з білками родини WASP, а також з іншими адаптерними білками, такими як Тоса-1, Tuba, ITSN і TKS4, забезпечує координацію процесів полімеризації актину, формування клітинних протрузій і клітинної міграції. Подальше дослідження білків-партнерів CR16 є перспективним напрямком сучасної клітинної біології.

1.4. Експресія CR16 у клітинах різного походження

Експресія білка CR16 (WIPF3) у клітинах людини є складним і багаторівневим процесом, що характеризується значною варіабельністю залежно від типу клітини, ступеня її диференціації, фізіологічного стану та впливу зовнішніх факторів. Як член родини верпролінових білків, CR16 демонструє загальні риси експресії, характерні для цієї групи, однак має виражену тканинну специфічність, що відображає його функціональну спеціалізацію у регуляції актинового цитоскелета [9, 20]. Відомо, що білки цієї родини беруть участь у передачі сигналів від мембрани до цитоскелета, що обумовлює їх участь у широкому спектрі клітинних процесів, включаючи міграцію, адгезію, ендоцитоз та морфогенез [10, 12].

Перші дані щодо експресії CR16 були отримані у нервовій тканині, де цей білок був ідентифікований як нейрон-специфічний пролін-збагачений білок. Подальші дослідження показали, що CR16 активно експресується у нейронах гіпокампу, кори головного мозку та інших відділів центральної нервової системи [1, 22]. Його локалізація у дендритах і аксонах свідчить про участь у формуванні та підтриманні нейрональних відростків, а також у регуляції синаптичної пластичності. Оскільки актиновий цитоскелет відіграє ключову роль у функціонуванні синапсів, CR16 може впливати на нейрональну передачу сигналів, формування пам'яті та адаптаційні процеси [37].

Регуляція експресії CR16 у нервовій системі є чутливою до впливу гормональних і стресових факторів. Зокрема, глюкокортикоїди здатні змінювати рівень експресії відповідних мРНК у нейронах, що було продемонстровано у ряді експериментальних досліджень [31, 32]. Така регуляція може бути пов'язана з перебудовою актинового цитоскелета нейронів у відповідь на стрес, що забезпечує адаптацію клітин до змін умов середовища. Крім того, вплив нейромедіаторів і факторів росту також може

модулювати експресію CR16, що свідчить про його інтеграцію у складні сигнальні мережі нервової системи [38].

Високий рівень експресії CR16 спостерігається у клітинах репродуктивної системи, зокрема у тестикулах. Було показано, що CR16 локалізується у клітинах Сертолі, де він бере участь у формуванні міжклітинних контактів і регуляції актинового цитоскелета [1, 2]. Взаємодія CR16 з N-WASP у цих клітинах є необхідною для правильної організації цитоскелетних структур, що забезпечують підтримку та диференціацію сперматогоній. Експериментальні дані на тваринних моделях показали, що відсутність CR16 призводить до порушення сперматогенезу та розвитку чоловічої стерильності, що підкреслює його ключову роль у репродуктивній функції [29].

У клітинах імунної системи експресія CR16 пов'язана з регуляцією клітинної рухливості та імунної відповіді. Відомо, що білки родини верпролінів взаємодіють із WASP і беруть участь у процесах хемотаксису, забезпечуючи перебудову актинового цитоскелета [30]. CR16 може відігравати аналогічну роль, сприяючи переміщенню імунних клітин до місця запалення. Крім того, експресія CR16 у цих клітинах може регулюватися цитокінами та іншими сигнальними молекулами, що беруть участь у розвитку запальної відповіді [39]. Це вказує на можливу участь CR16 у патогенезі запальних та аутоімунних захворювань.

Експресія CR16 у клітинах епітеліального походження має більш помірний характер, однак вона є функціонально значущою. Оскільки актиновий цитоскелет визначає полярність клітин і формування міжклітинних контактів, CR16 може бути залучений до підтримання бар'єрної функції епітелію та регуляції клітинної адгезії [9, 12]. У мезенхімальних клітинах CR16 може брати участь у процесах клітинної міграції та ремоделювання позаклітинного матриксу, що є важливими для ембріонального розвитку, загоєння ран і регенерації тканин [13, 20].

Особливу увагу привертає експресія CR16 у спеціалізованих клітинах, таких як подоцити нирок. Ці клітини мають складну архітектуру цитоскелета, що забезпечує функціонування фільтраційного бар'єра. Було показано, що CR16 є одним із білків, що експресуються у подоцитах і можуть брати участь у регуляції їх структурної організації [17]. Порушення експресії CR16 у цих клітинах може призводити до змін їх морфології та функції, що має значення для розвитку ниркових захворювань.

У пухлинних клітинних лініях експресія CR16 може змінюватися залежно від стадії розвитку пухлини та її інвазивного потенціалу. Відомо, що перебудова актинового цитоскелета є ключовим елементом клітинної міграції та метастазування, тому білки, що регулюють ці процеси, можуть відігравати важливу роль у канцерогенезі [40]. Деякі дослідження вказують на зв'язок варіантів гена WIPF3 з розвитком судинних патологій, що може свідчити про його участь у патологічних процесах [21].

Сучасні високопродуктивні методи аналізу експресії генів, такі як секвенування РНК (RNA-seq), мікрочіпові технології та мас-спектрометрія, дозволяють більш детально охарактеризувати профілі експресії CR16 у різних тканинах і клітинних типах. Дані великих консорціумів, зокрема GTEx та Human Protein Atlas, підтверджують, що експресія WIPF3 є нерівномірною і характеризується підвищеним рівнем у нервовій тканині та органах репродуктивної системи [41, 42]. Крім того, результати транскриптомних досліджень свідчать про можливу коекспресію CR16 з генами, що кодують інші компоненти актинового цитоскелета, що вказує на їх спільну функціональну роль [43].

Регуляція експресії CR16 відбувається на різних рівнях, включаючи транскрипційний, посттранскрипційний і посттрансляційний. Зокрема, активність транскрипційних факторів, стабільність мРНК та ефективність трансляції можуть впливати на рівень білка у клітині [44]. Також можливі

механізми епігенетичної регуляції, такі як метилювання ДНК та модифікації гістонів, можуть визначати рівень експресії CR16 у різних тканинах [45].

Експресія CR16 є динамічним і багатофакторним процесом, що залежить від типу клітин, їх функціонального стану та умов середовища. Високий рівень експресії у нейронах і клітинах репродуктивної системи свідчить про його ключову роль у спеціалізованих функціях, тоді як його присутність у клітинах імунної системи, епітеліальних структурах і подоцитах підкреслює універсальність його біологічної ролі. Диференційна експресія CR16 визначає особливості клітинної поведінки та має важливе значення як у нормальних фізіологічних процесах, так і у розвитку патологій.

Отже, актуальність цієї роботи полягає у дослідженні молекулярних механізмів функціонування клітини та ролі білка CR16 у процесах міжбілкової взаємодії. Аналіз експресії CR16 у клітинах різного походження дозволяє краще зрозуміти механізми передачі сигналів, клітинної проліферації та організації цитоскелета.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та реактиви

У роботі використовували органічні та неорганічні хімічні реактиви виробництва компаній «Merck» (Німеччина), «Serva» (Німеччина), «Difco» (США), «NEB» (США), «Sigma Aldrich» (Німеччина), «Fluka» (США), «BioRad» (США), «Amersham Pharmacia Biotech» (США), «Thermo Fisher Scientific» (США) або вітчизняні реактиви кваліфікації «хч» і «осч». Використовували ферменти компанії «Thermo Fisher Scientific» (США): ендонуклеази рестрикції; фрагмент Кленова; T4 ДНК-лігаза; інгібітор РНКаз «RiboLock»; ДНКаз I; зворотна транскриптаза «RevertAid H Minus»; зворотна транскриптаза «M-MuLV». Суміш dNTP та праймери «oligo-(dT)15» для проведення ПЛР також було придбано у компанії «Thermo Fisher Scientific» (США). Для кількісної ПЛР в реальному часі було використано «DreamTaq» полімерази виробництва «Thermo Fisher Scientific» (США). Для виділення тотальної РНК з клітинних ліній людини використовували реагент «RNA Go» компанії «BioLabTech» (Україна). Модифіковане середовище Ігла Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)), фетальна бичача сироватка (Fetal Bovine Serum (FBS)) було придбано в компанії «Sigma-Aldrich» (Німеччина).

Обладнання: ампліфікатор «TC-TE» («BOECO», Німеччина), «CFX96» («Bio-Rad»); вортекс, ротатор, джерело безперебійного струму («BioRad», США), інвертований фазово-контрастний мікроскоп «DIAPHOT 300» («BioRad», США), медичний відсмоктувач «7E-B» («Біомед», Україна), камера для вертикального електрофорезу («BioRad», США), термостат «МК2000-1» («Hangzhou Allsheng», Китай), система гель-документації

«ChemiDoc XRS+ System» («BioRad», США), спектрофотометр «NanoDrop 2000» («Life Technologies», США), центрифуга «CM-6MT» («ELMI», Латвія), центрифуга з охолодженням «5415R» («Eppendorf», Німеччина), центрифуга з охолодженням «MR22I» («Jouan», Франція), CO₂-інкубатор «CellExpert C170» («Eppendorf», Німеччина).

2.2. Культури клітин та біологічний матеріал

У роботі використовували лінії клітин людини: ембріональна нирка людини (HEK293); рак шийки матки (HeLa); клітини сітківки ока (ARPE-19); рак молочної залози (T-47D, MCF-7 та MDA-MB-231); гліобластома (U-251 MG, U-87 MG та T98G); нейробластома (SH-SY5Y); аденокарцинома яєчника (SKOV-3); фібросаркома (HT1080); нормальні фібробласти шкіри (HaCat); епідермоїдна карцинома шкіри (A431); меланома шкіри (WM793); гепатоцелюлярна карцинома (Hep G2); колоректальна аденокарцинома (HT-29); карцинома легень (A549); нирково-клітинна карцинома (KRC/Y); семінома яєчка (JKT-1); нормальні клітини простати (PNT2); рак простати (DU145, LNCaP та PC-3); карцинома сечового міхура (5637 та T24).

2.3. Культивування культур клітин

Культури клітин людини культивували в середовищі (DMEM) з додаванням 10 % FBS, 50 од/мл пеніциліну та 100 мг/мл стрептоміцину. Культивування відбувалося в інкубаторі при температурі 37°C, 5 % CO₂ та 95 % вологості. При досягненні клітинами 70-90 % стану конфлюентності, проводили пасажування у потрібному для роботи розведенні кожні 3-5 днів. Для цього відбирали культуральне середовище, клітини промивали

фосфатно-сольовим буферним розчином (Phosphate-buffered saline, PBS) та інкубували в розчині 0,05 % трипсину з 0,053 мМ етилендіамінтетраоцтовою кислотою (ЕДТА) за кімнатної температури протягом 3-10 хв. Потім клітини ресуспендували в DMEM з додаванням усіх необхідних компонентів та переносили в нові культуральні чашки або планшети.

2.4. Виділення тотальної РНК з клітинних ліній

Клітинні лінії людини після культивування двічі промивали буфером PBS після чого відразу проводили виділення тотальної РНК або зберігали до використання при -70°C . Виділення тотальної РНК з 5×10^6 клітин проводили гуанідинізоціонатним методом із використанням реагенту «RNA Go» відповідно до рекомендацій фірми виробника.

2.5. Очищення препаратів тотальної РНК від геномної ДНК

Для видалення залишків геномної ДНК, яка могла виділитися разом з РНК та давати неспецифічний сигнал при ПЛР, препарати тотальної РНК оброблялися ДНКазою I. Для цього в реакційну суміш, загальним об'ємом 15 мкл, вносили 1-5 мкг тотальної РНК, 1,5 мкл $10\times$ буферного розчину, 0,5 мкл інгібітора РНКаз (40 од./мкл) та 3 мкл ДНКаз I (50 од./мкл).

Інкубацію проводили при $+37^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хв. Після цього проводили інактивацію ДНКаз I шляхом додавання 3 мкл 25мМ ЕДТА та інкубації при $+65^{\circ}\text{C}$ протягом 10 хв. Отриманий препарат РНК відразу використовували для синтезу кДНК.

2.6. Синтез кДНК на препараті тотальної РНК

Для зворотної транскрипції використовували тотальну РНК із клітинних ліній. В реакційну мікропробірку вносили необхідну кількість води вільної від РНКаз, яка потрібна, щоб після додавання всіх інших компонентів загальний об'єм складав 20 мкл, 1-8 мкг тотальної РНК, попередньо очищеною від домішків геномної ДНК та праймер («Oligo dT15») в кількості 100 мкМ. Проводили денатурацію РНК при +65°C протягом 10 хв. Після чого додавали 4 мкл 5× буферного розчину, 2 мкл 10 мМ дНТФ, 0,5 мкл інгібітора РНКаз (40 од./мкл) та 1 мкл RevertAid H Minus зворотної транскриптази (50 од./мкл). Синтез кДНК проводили при +42°C протягом однієї год на ампліфікаторі «ТС-ТЕ». До подальшого використання кДНК зберігали при -20°C.

2.7. Кількісна ПЛР у реальному часі з використанням Taq-Man зондів

Кількісну ПЛР в реальному часі проводили в 25 мкл суміші, що містила 0,2 мкМ кожного специфічного праймера і 0,1 мкМ зонда Taq-Man, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дНТФ, 2,5 одиниці ДНК-полімерази DreamTaq і відповідний буферний розчин. Ампліфікація проводилася протягом 50 циклів за таких умов – денатурація: +95°C, 20 с (2 хв для першого циклу); реасоціація праймерів і синтез поєднували при +60°C протягом 1 хв. Кожен зразок аналізувався у двох або трьох повторах. Кількісна ПЛР проводилася за допомогою ампліфікатора «CFX96». Ген *TBP* (ген, що кодує ТАТА-зв'язувальний білок (ТАТА-binding protein)) був обраний як референсний ген на основі аналізу літературних джерел, які продемонстрували його придатність як контролю для аналізу експресії генів у раку молочної залози людини [28, 46, 47]. Праймери та Taq-Man зонди були підібрані з використанням програми «OLIGO Version 7.60».

Праймери та Taq-Man зонди, що використовувалися для кількісної ПЛР:
 прямий: CR16 1494-1513 5'aaaccatgccagaagattta3';
 зворотний: CR16 1587-1606 5'gaatttctgcctttgatgtc3';
 Taq-Man probe CR16 1524-1543 5'(HEX)atccccagaagccgtacacc(BHQ1)3';
 прямий: 800-820 5'gtgcccgaacgccgaatata3';
 Taq-Man зонд 821-842 5'(BHQ1)atcccaagcggtttgctgcgggt(FAM)3';
 зворотний: 874-854 5'ccgtggttcgtggctctctta3'.

2.8. Обчислення результатів кількісної ПЛР у реальному часі

Для кількісної ПЛР в реальному часі використовувався ампліфікатор «CFX96» з програмним забезпеченням «CFX Maestro 2.3 версії 5.3.022.1030». Для розрахунку результатів кількісної ПЛР використовувалася формула:

$$Exp = 2^{(E_{ref} - Ct(ref) - E_{target} - Ct(target))}, \quad (2.1)$$

де E_{target} – ефективність ПЛР для цільового гена;

E_{ref} – ефективність ПЛР для референсного гена;

$Ct(target)$ – середнє значення циклів для цільового гена;

а $Ct(ref)$ – середнє значення циклів для референсного гена.

Ефективність ПЛР визначалася за допомогою програмного забезпечення «LinRegPCR версії 2021.2». Значення циклів для цільового та референсного генів визначалися за допомогою вбудованого в програмне забезпечення методу регресії.

Статистична обробка даних кількісної ПЛР проводилася автоматично, за допомогою програмного забезпечення «CFX Maestro 2.3» версії «5.3.022.1030» (односпрямований дисперсійний аналіз (ANOVA), пост-тест Тукея). Отримані

результати наведені у вигляді середнього арифметичного $\pm$ середньоквадратичне відхилення – SD.

Результати вважали значущими, коли $p \leq 0,05$.

2.9. Проведення GST Pull-Down аналізу білок-білкових взаємодій

Для дослідження білок-білкових взаємодій використовували метод GST Pull-Down аналізу із застосуванням глутатіон-сефарозних кульок. Перед проведенням аналізу GST-сефарозу (8 мкл) чотириразово промивали 1 мл відповідним буферним розчином («IP») шляхом центрифугування при 500 g (≈ 2300 об./хв) протягом 1 хв при температурі $+4^{\circ}\text{C}$. Після кожного промивання супернатант видаляли. До відмитої сефарози додавали вищезазначений буферний розчин до кінцевого об'єму не менше 500 мкл та вносили лізат, що містив GST-злитий білок. Інкубацію проводили на шейкері протягом 40-60 хв при $+4^{\circ}\text{C}$. Паралельно розморожували лізати еукаріотичних клітин, попередньо трансфікованих цільовою плазмідною. Лізати центрифугували протягом 10 хв при максимальних обертах та температурі $+4^{\circ}\text{C}$ для видалення нерозчинних компонентів. Після центрифугування супернатант переносили у попередньо охолоджені пробірки та перемішували. Частина лізату (20-50 мкл) відбирали як контроль. Після інкубації GST-злитого білка з сефарозою суміш центрифугували протягом 1 хв при 500 g та $+4^{\circ}\text{C}$. Осад промивали чотириразово 1 мл «IP»- або «PD»-буферного розчину за аналогічних умов для видалення неспецифічно зв'язаних білків. До отриманого осаду додавали лізат трансфікованих еукаріотичних клітин у кількості, що залежала від концентрації досліджуваного білка. Інкубацію проводили на шейкері при $+4^{\circ}\text{C}$ протягом 60-90 хв (за необхідності – протягом ночі). Після інкубації зразки центрифугували протягом 1 хв при 500 g та $+4^{\circ}\text{C}$, супернатант видаляли, а осад промивали 3-4 рази 1 мл «IP»-буферного розчину

для зниження рівня неспецифічного зв'язування. Отриманий білковий комплекс елюювали шляхом додавання 15 мкл буферного розчину Леммлі з подальшим кип'ятінням протягом 10 хв. Зразки аналізували методом електрофорезу в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (ДСН-ПААГ) з подальшим вестерн-блот аналізом.

2.10. Диск-електрофорез в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію за методикою Леммлі

Електрофоретичне розділення протеїнів за методом Лемлі у денатуруючих умовах проводили в поліакриламідному гелі (ПААГ) у камерах для вертикального електрофорезу виробництва за методикою фірми виробника. Для протеїнового електрофорезу використовували 4 % концентруючий та розділяючі гелі з концентрацією 7,5-15 %. Для приготування розділяючого гелю змішували 30 % розчин акриламиду (при співвідношенні акриламиду і біс-акриламиду – 29:1), dist H₂O, 1,5мМ трис-НСІ (рН 8.8), 10 % розчин додецилсульфату натрію (ДСН) до кінцевої концентрації 375 мМ та 0,1 % персульфат амонію. Полімеризація акриламиду ініціювалася додаванням 0,1 % N,N,N',N'-тетраметилетилендіамін (TEMED). Проводили електрофорез в трис-гліциновому буферному розчині (195 мМ гліцин, 25 мМ трис-НСІ (рН 8.3), 0,1 % ДСН) при фіксованій силі струму 20-30 мА.

2.11. Вестерн-блот аналіз

Після електрофоретичного розділення протеїнів в ПААГ за методом Леммлі, протеїни переносили на нітроцелюлозні мембрани в буфері для перенесення (192 мМ гліцин, 25 мМ трис-НСІ, 20 % етанол) при 250 мА

протягом 1-2 год у апараті для електроперенесення «TE22 Mighty Small Transfer Tank» («Hoefer», США). Після перенесення мембрану блокували протягом 40-60 хв у розчині 5 % знежиреного молока в TBS-T (20 мМ трис-НСІ (рН 8.0), 150 мМ NaCl, 0,1 % Triton X-100), щоб запобігти неспецифічному зв'язуванню антитіл. Далі мембрану інкубували з відповідними первинними антитілами протягом 1 год та відмивали від первинних антитіл три рази по 5 хв буферним розчином TBS-T. Після промивання мембрану інкубували протягом 40-60 хв в розчині вторинних антитіл відповідної специфічності з подальшим відмиванням TBS-T так само, як описано вище.

Для хемолюмінісцентної детекції готували розчин: 100 мМ трис-НСІ (рН 8.5), 2,5 мМ люмінол, 0,4 мМ кумарова кислота, 0,023 % H_2O_2 ; та інкубували мембрану в отриманій суміші протягом 1 хв. Детекцію хемілюмінісцентного сигналу проводили за допомогою приладу «Molecular Imager ChemiDoc XRS+» («BioRad», США).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Аналіз експресії *CR16* у панелі клітин людини

Для визначення рівня експресії гена *CR16* у клітинних лініях людини різного походження було проведено зворотно-транскрипційну кількісну ПЛР у реальному часі (ЗТ-кПЛР). Отримані значення нормалізували відносно референсного гена, що дозволило порівняти рівні транскрипції між різними клітинними моделями. Результати представлені на рис. 3.1 у вигляді стовпчастої діаграми, де значення наведені як середні величини із стандартною помилкою.

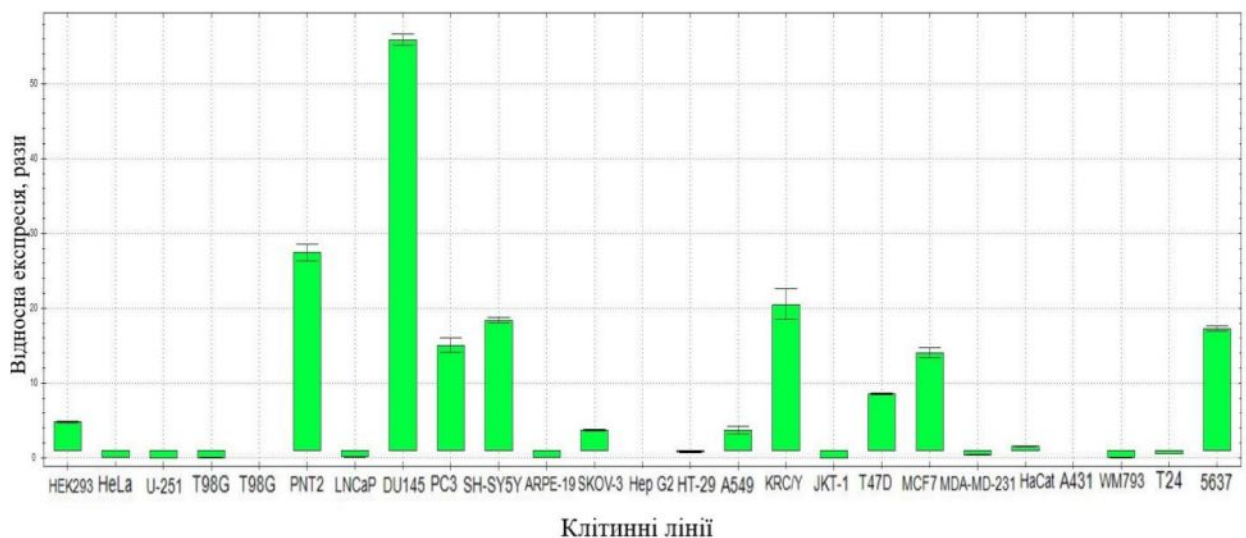


Рис. 3.1. Відносна експресія гена *CR16* у панелі клітинних ліній людини ($M \pm SD$, $n = 3$)

Аналіз отриманих даних свідчить про значну варіабельність експресії *CR16* між досліджуваними клітинними лініями, що вказує на виражену клітинно-специфічну регуляцію цього гена. Найвищий рівень експресії

виявлено у клітинній лінії DU145 (рак простати), де значення суттєво перевищує всі інші досліджувані зразки. Високі рівні експресії також були характерні для PNT2 (нормальні епітеліальні клітини простати), KRC/Y (нирково-клітинна карцинома), SH-SY5Y (нейробластома) та 5637 (карцинома сечового міхура). Помірна експресія спостерігалась у клітинних лініях PC3, MCF7, T47D, а також T24, що представляють різні типи карцином.

Натомість низький рівень експресії *CR16* виявлено у клітинних лініях HeLa (рак шийки матки), U-251 та U-87 MG (гліобластома), LNCaP (андроген-залежний рак простати), ARPE-19 (ретинальний пігментний епітелій), Hep G2 (гепатоцелюлярна карцинома), JKT-1 (семінома), MDA-MB-231 (трипл-негативний рак молочної залози), HaCaT (нормальні кератиноцити) та WM793 (меланома). У клітинних лініях HT-29 та A431 рівень експресії був близьким до мінімального, що може свідчити про слабку транскрипційну активність гена *CR16* у даних клітинних типах.

Виявлена гетерогенність експресії *CR16* узгоджується з сучасними уявленнями про тканинно-специфічну регуляцію генів, яка визначається як транскрипційними механізмами (активність промоторів, транскрипційних факторів), так і посттранскрипційними процесами, включаючи стабільність мРНК та регуляцію мікроРНК. Крім того, епігенетичні модифікації, такі як метилування ДНК та модифікації гістонів, можуть відігравати ключову роль у визначенні рівня експресії *CR16* у різних клітинних контекстах [48].

Особливу увагу привертає високий рівень експресії *CR16* у клітинних лініях раку простати (DU145, PC3) порівняно з андроген-залежною лінією LNCaP, де експресія є мінімальною. Така різниця може відображати участь *CR16* у механізмах прогресії пухлини та переходу до андроген-незалежного фенотипу, що є характерною рисою агресивних форм раку простати [49]. Водночас високий рівень експресії у нормальній лінії PNT2 свідчить про можливу фізіологічну роль *CR16* у клітинах простатичного епітелію.

Підвищена експресія *CR16* у клітинній лінії SH-SY5Y може вказувати на

його потенційну роль у нейрональних процесах, таких як диференціація, міграція або формування клітинного цитоскелету. Відомо, що білки, асоційовані з актиновим цитоскелетом та сигнальними шляхами, відіграють важливу роль у розвитку нервової системи [50]. Таким чином, CR16 може бути залучений до подібних процесів.

Високий рівень експресії цього гена у клітинних лініях KRC/Y та 5637 також може свідчити про участь CR16 у регуляції проліферації та міграції клітин, що є ключовими характеристиками пухлинного процесу. У цьому контексті важливо зазначити, що зміни експресії генів, пов'язаних із цитоскелетом, адгезією та сигнальними шляхами, часто корелюють з інвазивним потенціалом пухлин [51].

Низький рівень експресії *CR16* у гліобластомних клітинних лініях (U-251, U-87 MG) може вказувати на обмежену роль цього гена у клітинах гліального походження або ж на наявність альтернативних механізмів регуляції клітинної поведінки у цих пухлинах. Аналогічно, низька експресія у клітинах MDA-MB-231 може бути пов'язана зі специфікою сигнальних шляхів, характерних для тричі-негативного раку молочної залози.

Слід також враховувати, що відмінності у рівнях експресії можуть бути зумовлені не лише транскрипційною активністю, але й ефективністю трансляції та стабільністю білка. Посттрансляційні модифікації, такі як фосфорилування або убіквітинування, можуть впливати на функціональну активність CR16 та його участь у білок-білкових взаємодіях [52].

Таким чином, отримані результати демонструють, що експресія гена *CR16* є високо варіабельною та залежить від клітинного типу і походження. Виявлені закономірності дозволяють припустити, що CR16 може бути залучений до регуляції процесів, пов'язаних із проліферацією, диференціацією та міграцією клітин, а також до формування пухлинного фенотипу. Це створює підґрунтя для подальших досліджень, спрямованих на ідентифікацію функціональних партнерів CR16 та з'ясування його ролі у

молекулярних механізмах пухлинної прогресії.

3.2. Синтез CR16 у клітинних лініях людини різного походження

З метою дослідження рівня синтезу білка CR16 у клітинних лініях людини різного походження було проведено Вестерн-блот аналіз тотальних клітинних лізатів із використанням специфічного антитіла до CR16. Для контролю кількості нанесеного білка застосовували антитіло до β -тубуліну, який використовували як референсний білок. Результати аналізу представлені на рис. 3.2.

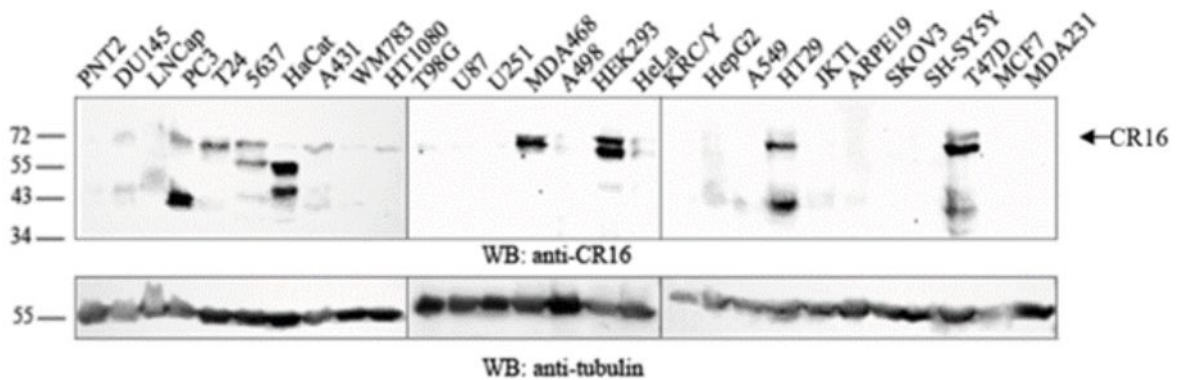


Рис. 3.2. Блотограма рівня синтезу білка CR16 у лізатах клітинних ліній людини: WB – вестерн-блот

Отримані дані свідчать про наявність імунореактивних смуг у діапазоні приблизно 55-72 кДа, що відповідає очікуваній молекулярній масі білка CR16 та, ймовірно, відображає існування декількох його молекулярних форм. Варіабельність електрофоретичної рухливості може бути зумовлена як альтернативним сплайсингом, так і посттрансляційними модифікаціями, включаючи фосфорилювання, убіквітування або частковий протеолітичний процесинг, що характерно для білків, залучених у сигнальні та цитоскелетні процеси [52, 53].

Аналіз інтенсивності сигналів показав виражену гетерогенність синтезу CR16 серед досліджуваних клітинних ліній, що вказує на її чітку залежність від тканинного походження клітин, їхнього функціонального стану та ступеня трансформації. Найвищий рівень синтезу білка CR16 було виявлено у клітинних лініях HaCaT, MDA-MB-468, HEK293, HT-29 та T47D. Вказані клітинні моделі представляють як нормальні епітеліальні клітини (HaCaT, HEK293), так і пухлинні клітини різного походження, що свідчить про можливу універсальну роль CR16 у клітинах епітеліального типу.

Зокрема, високий експресія у клітинній лінії HaCaT (безсмертні кератиноцити) може вказувати на участь CR16 у підтриманні структурної організації епітелію, регуляції міжклітинних контактів та актинового цитоскелету. Відомо, що клітини епітеліального походження характеризуються високим рівнем динаміки клітинних контактів і цитоскелетних перебудов, що є критично важливими для процесів проліферації та диференціації. Аналогічно, висока експресія CR16 у HEK293, які походять із ембріональної ниркової тканини, може бути пов'язана з високою метаболічною активністю та здатністю до швидкого росту, що супроводжується активною регуляцією сигнальних шляхів.

У клітинних лініях пухлинного походження, таких як MDA-MB-468 (рак молочної залози), T47D (гормон-залежний рак молочної залози) та HT-29 (колоректальна карцинома), високий рівень синтезу CR16 може відображати його участь у процесах пухлинної прогресії. Відомо, що зміни в експресії білків, пов'язаних із цитоскелетом, клітинною адгезією та сигнальними каскадами, є ключовими факторами, що визначають інвазивний потенціал пухлинних клітин [51]. Зокрема, клітинні лінії молочної залози демонструють різні фенотипи залежно від рівня диференціації та гормонального статусу, і підвищена експресія CR16 у MDA-MB-468 і T47D може свідчити про його залучення до регуляції цих процесів.

Помірний рівень експресії CR16 виявлено у клітинних лініях DU145, PC3,

5637, A431, HT1080 та HeLa, що представляють різні типи пухлин (рак простати, сечового міхура, епідермоїдну карциному шкіри, фібросаркому та рак шийки матки відповідно). Такий рівень експресії може відображати базову функціональну роль CR16 у підтриманні клітинної життєздатності та організації цитоскелету без суттєвої активації специфічних сигнальних шляхів. У випадку клітин простати (DU145, PC3) варто зазначити, що ці лінії є андроген-незалежними та характеризуються більш агресивним фенотипом порівняно з LNCaP, однак рівень CR16 у них не досягає максимальних значень, що може свідчити про участь додаткових факторів у регуляції їх інвазивності [49].

Низький або майже відсутній рівень синтезу CR16 спостерігався у клітинних лініях LNCaP, JKT-1, ARPE-19 та MDA-MB-231. Такий профіль може бути пов'язаний із специфічними особливостями клітинного походження або активністю альтернативних сигнальних шляхів. Наприклад, клітинна лінія MDA-MB-231, яка є однією з найбільш інвазивних моделей раку молочної залози, демонструє низький рівень CR16, що може вказувати на використання CR16-незалежних механізмів інвазії. Відомо, що пухлинні клітини можуть використовувати різні стратегії міграції, включаючи мезенхімальний та амебоїдний типи руху, які залежать від різних молекулярних компонентів [54].

Низька експресія у клітинній лінії LNCaP (андроген-залежний рак простати) порівняно з більш агресивними DU145 і PC3 може відображати роль CR16 у процесах пухлинної прогресії, пов'язаних із втратою гормональної залежності. Аналогічно, низький рівень синтезу у HeLa може свідчити про те, що CR16 не є критичним компонентом для підтримання проліферації клітин цього типу або ж його функція компенсується іншими білками.

Важливим аспектом є також те, що рівень синтезу CR16 не завжди прямо корелює з біологічними властивостями клітин, такими як інвазивність або проліферативна активність. Це вказує на складну багаторівневу регуляцію

функції CR16, яка може залежати не лише від його кількості, але й від локалізації у клітині, посттрансляційних модифікацій та взаємодії з білками-партнерами [55]. Зокрема, для багатьох адаптерних білків критичним є формування багатокомпонентних білкових комплексів, що забезпечують передачу сигналів та організацію цитоскелету.

Контрольний білок β -тубулін демонстрував стабільний рівень експресії у всіх досліджених зразках, що підтверджує відсутність значних відмінностей у завантаженні білка та коректність порівняння результатів.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що синтез CR16 має виражений клітинно-типовий характер і залежить від тканинного походження, ступеня диференціації та трансформації клітин. Високий рівень експресії у ряді епітеліальних та пухлинних клітинних ліній вказує на потенційну роль CR16 у регуляції процесів, пов'язаних із клітинною архітектурою, адгезією та сигнальною трансдукцією. Водночас відсутність прямої кореляції між рівнем експресії та інвазивним потенціалом клітин підкреслює необхідність подальших досліджень, спрямованих на вивчення функціональних взаємодій CR16 з білками-партнерами та його ролі у формуванні клітинного фенотипу.

Варто зазначити, що рівень експресії гена *CR16* не завжди повністю відповідав рівню синтезу білка. Подібні відмінності є поширеним явищем у клітинній біології та можуть пояснюватися багаторівневою регуляцією експресії генів. Зокрема, кількість мРНК не завжди прямо корелює з кількістю синтезованого білка через відмінності у стабільності мРНК, ефективності трансляції, швидкості деградації білка, а також вплив посттрансляційних модифікацій. Крім того, білок CR16 може зазнавати швидкого протеолітичного процесингу або функціонувати у складі білкових комплексів, що також впливає на інтенсивність сигналу при Вестерн-блот аналізі. Таким чином, результати кількісної ПЛР та вестерн-блоту слід розглядати як взаємодоповнюючі методи оцінки експресії гена *CR16* та його білкового продукту на транскрипційному та протеїновому рівнях відповідно.

3.3. Ідентифікації протеїнів-партнерів CR16

З метою ідентифікації потенційних білків-партнерів CR16 було проведено GST Pull-Down аналіз із використанням рекомбінантних GST-злитих SH2-доменів різних сигнальних протеїнів та Мус-CR16, експресований у клітинах еукаріот разом з домінантноактивним мутантом SRC-кінази що забезпечувало тирозинове фосфорилування CR16.

Для виявлення зв'язаного CR16 використовували імуноблотинг із антитілом до Мус, тоді як рівень завантаження та цілісність GST-злитих білків контролювали за допомогою фарбування Кумасі (рис. 3.3). Як можна побачити на рис. 3.3, у верхній панелі представлено результати імуноблотингу з антитілом anti-Мус, що відображають зв'язування Мус-CR16 із GST-SH2-доменами. Як негативний контроль використовували GST без SH2-домену. Доріжка «КЛ» відповідає клітинному лізату та демонструє рівень експресії Мус-CR16. Нижня панель демонструє фарбування Кумасі, що підтверджує наявність та приблизно однакову кількість GST-злитих білків у зразках

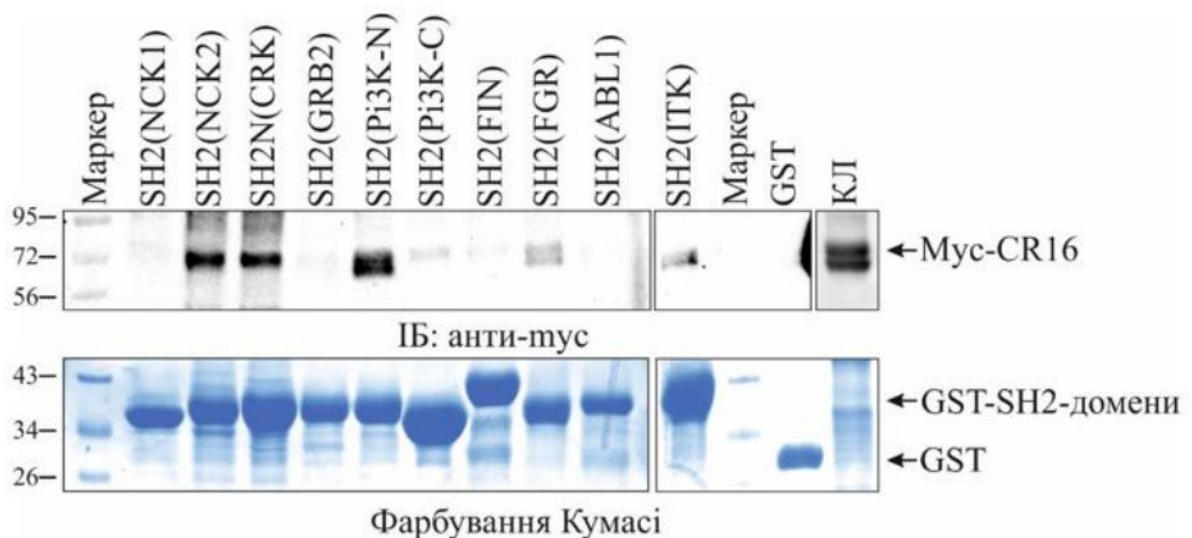


Рис. 3.3. Блотограма GST Pull-Down аналізу взаємодії CR16 з SH2-доменами сигнальних білків: IB – імуноблотинг, КЛ – клітинний лізат

Аналіз результатів показав, що CR16 характеризується вибірковою здатністю до взаємодії з окремими SH2-доменами. Найбільш інтенсивні сигнали, що відповідають зв'язаному Мус-CR16, спостерігались у випадку SH2-доменів NCK2, CRK та PI3K-N. Крім того, помітна взаємодія виявлялася також із SH2-доменами FGR, PI3K-C та ITK. Для SH2-доменів NCK1, GRB2, FYN та ABL1 сигнал був слабким або практично відсутнім.

Контроль із використанням GST без SH2-домену не демонструє специфічного зв'язування CR16, що підтверджує специфічність виявлених взаємодій. Крім того, контроль клітинного лізату (КЛ) свідчить про наявність достатнього рівня експресії Мус-CR16 для проведення аналізу.

Фарбування Кумасі показало наявність GST-злитих білків у всіх досліджуваних зразках та відсутність суттєвих відмінностей у їх кількості. Відповідні смуги GST-SH2 білків локалізуються в діапазоні приблизно 30–50 кДа залежно від розміру SH2-домену, тоді як чистий GST має молекулярну масу близько 26 кДа. Це свідчить про коректність очищення рекомбінантних білків та дозволяє виключити вплив нерівномірного завантаження на результати експерименту.

Отримані результати свідчать про те, що CR16 потенційно залучений до сигнальних каскадів, асоційованих із тирозиновим фосфорилуванням та SH2-залежними білок-білковими взаємодіями. Встановлена взаємодія з SH2-доменами білків NCK2 та CRK є особливо цікавою, оскільки дані адаптерні білки відіграють ключову роль у передачі сигналів від рецепторних тирозинкіназ до ефекторів, що регулюють динаміку актинового цитоскелету, клітинну адгезію та міграцію [56, 57]. Білки родини NCK функціонують як молекулярні адаптери, що координують формування сигнальних комплексів у відповідь на активацію тирозинкіназних рецепторів, тоді як CRK бере участь у регуляції клітинної пластичності та ремоделюванні цитоскелету [58].

Взаємодія CR16 з SH2-доменами PI3K також може мати важливе функціональне значення. PI3K-сигнальний шлях є одним із центральних

механізмів регуляції клітинного росту, проліферації, виживання та метаболізму [59]. Активація PI3K часто асоційована з пухлинною трансформацією та прогресією злоякісних новоутворень. Тому взаємодія CR16 з PI3K може свідчити про його потенційну участь у регуляції PI3K-залежних сигнальних каскадів.

Виявлена взаємодія з SH2-доменом FGR також заслуговує уваги, оскільки FGR належить до родини SRC-подібних тирозинових кіназ, які регулюють клітинну адгезію, проліферацію та сигнальну трансдукцію [60]. Це може свідчити про функціональний зв'язок CR16 із SRC-залежними сигнальними мережами. Слабка, але помітна взаємодія з ITK може вказувати на можливість залучення CR16 до окремих сигнальних процесів, пов'язаних із тирозиновими кіназами родини TEC.

Водночас відсутність вираженої взаємодії з SH2-доменами GRB2, FYN та ABL1 свідчить про селективність зв'язування CR16 та обмежене коло його потенційних партнерів. Така вибірковість є характерною рисою адаптерних білків, які формують специфічні сигнальні комплекси залежно від типу клітини, рівня фосфорилування та активності сигнальних шляхів [61]. У сукупності отримані результати свідчать про те, що CR16 є потенційним адаптерним білком, здатним взаємодіяти з ключовими компонентами тирозинкіназних сигнальних шляхів. Виявлені взаємодії можуть лежати в основі його участі у регуляції клітинної міграції, проліферації та інвазивності, що узгоджується з даними про варіабельну експресію CR16 у різних клітинних лініях.

Таким чином, GST Pull-Down аналіз дозволив ідентифікувати потенційних білків-партнерів CR16 та підтвердити його залучення до сигнальних комплексів, що відкриває перспективи для подальшого функціонального аналізу даного білка.

Отже, вивчення CR16 є перспективним через недостатню дослідженість цього білка та його можливу участь у важливих клітинних механізмах.

Отримані результати можуть бути використані у біотехнології для створення нових підходів до діагностики захворювань, пошуку біомаркерів та розробки терапевтичних стратегій. Дослідження білкових взаємодій також є перспективним для розвитку клітинної інженерії та технологій, пов'язаних із модифікацією клітинних процесів.

ВИСНОВКИ

Таким чином, у роботі проаналізовано експресію гена *CR16*, синтез та взаємодії *CR16* з протеїнами-партнерами у клітинах людини різного походження. Отримані результати можуть бути корисними для розробки нових діагностичних підходів та пошуку потенційних молекулярних мішеней для терапії онкозахворювань.

1. Встановлено найвищі значення експресії гена *CR16* у клітинних лініях PNT2, DU145, SH-SY5Y, KRC/Y та 5637, тоді як у ряді інших ліній рівень експресії був низьким. Отримані дані свідчать про залежність транскрипційної активності *CR16* від тканинного походження клітин та їх функціонального стану.

2. Виявлено найвищі рівні синтезу *CR16* у клітинних лініях HaCaT, MDA-MB-468, HEK293, HT-29 та T47D, у той час як в інших лініях (LNCaP, HeLa, MDA-MB-231) цей показник був низьким. Продемонстровано наявність декількох імунореактивних форм *CR16*, що може бути пов'язано з посттрансляційними модифікаціями або альтернативними варіантами білка.

3. Показано, що *CR16* здатний взаємодіяти з SH2-доменами білків NCK2, CRK та PI3K-N, це вказує на його залучення до тирозинкіназ-залежних сигнальних шляхів. Встановлена селективність взаємодій підтверджує можливу роль *CR16* як адаптерного білка, що бере участь у формуванні багатобілкових сигнальних комплексів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ho, H. Y., Rohatgi, R., Ma, L., and Kirschner, M. W. (2001). CR16 forms a complex with N-WASP in brain and is a novel member of a conserved proline-rich actin-binding protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), pp. 11306–11311.
2. Xiang, W., Wen, Z., Pang, W., Hu, L., Xiong, C., and Zhang, Y. (2011). CR16 forms a complex with N-WASP in human testes. *Cell and tissue research*, 344(3), pp. 519–526.
3. Cortesio, C. L., Perrin, B. J., Bennin, D. A., and Huttenlocher, A. (2010). Actin-binding protein-1 interacts with WASp-interacting protein to regulate growth factor-induced dorsal ruffle formation. *Molecular biology of the cell*, 21(1), pp. 186–197.
4. Yu, H., Chen, J. K., Feng, S., Dalgarno, D. C., Brauer, A. W., and Schreiber, S. L. (1994). Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell*, 76(5), pp. 933–945.
5. Pawson, T., and Scott, J. D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5346), pp. 2075–2080.
6. Mayer, B. J. (2001). SH3 domains: complexity in moderation. *Journal of cell science*, 114(7), pp. 1253–1263.
7. Csiszár, A. (2006). Structural and functional diversity of adaptor proteins involved in tyrosine kinase signalling. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 28(5), pp. 465–479.
8. Schlessinger J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 103(2), pp. 211–225.
9. Aspenström, P. (2005). The verprolin family of proteins: regulators of cell morphogenesis and endocytosis. *FEBS letters*, 579(24), pp. 5253–5259.
10. Pollard, T. D., Blanchoin, L., and Mullins, R. D. (2001). Actin dynamics. *Journal of cell science*, 114(1), pp. 3–4.

11. Ramesh, N., Antón, I. M., Hartwig, J. H., and Geha, R. S. (1997). WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), pp. 14671–14676.
12. Takenawa, T., and Suetsugu, S. (2007). The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(1), pp. 37–48.
13. Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., and Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302(5651), pp. 1704–1709.
14. Weaver, A. M. (2006). Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clinical and experimental metastasis*, 23(2), pp. 97–105.
15. Buccione, R., Orth, J. D., and McNiven, M. A. (2004). Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(8), pp. 647–657.
16. Kirschner, A., Strat, A. N., Yablonski, J., Yoo, H., Bagué, T., Li, H., Zhao, J., Bollinger, K. E., Herberg, S., and Ganapathy, P. S. (2021). Mechanosensitive channel inhibition attenuates TGF β 2-induced actin cytoskeletal remodeling and reactivity in mouse optic nerve head astrocytes. *Experimental eye research*, 212, p. 108791.
17. De Luca, F., Kha, M., Swärd, K., and Johansson, M. E. (2023). Identification of ARMH4 and WIPF3 as human podocyte proteins with potential roles in immunomodulation and cytoskeletal dynamics. *PloS one*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280270> [Accessed Apr. 2026]
18. Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M. W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*, 97(2), pp. 221–231.

19. Small, J. V., and Rottner, K. (2010). Elementary cellular processes driven by actin assembly: lamellipodia and filopodia. *Springer, Dordrecht*, [online]. Available at: https://doi.org/10.1007/978-90-481-9301-1_1 [Accessed Apr. 2026]
20. Aspenström, P. (2007). The verprolins as regulators of actin dynamics. In: Actin-monomer-binding proteins. molecular biology intelligence unit. Springer, New York, NY, [online]. Available at https://doi.org/10.1007/978-0-387-46407-7_9 [Accessed Apr. 2026].
21. Maeda, Y., Sato, N., Naka-Mieno, M., Mori, S., Arai, T., Tanaka, M., Muramatsu, M., and Sawabe, M. (2016). Association of non-synonymous variants in *WIPF3* and *LIPA* genes with abdominal aortic aneurysm: an autopsy study. *Journal of geriatric cardiology : JGC*, 13(12), pp. 960–967.
22. Weiler, M. C., Smith, J. L., and Masters, J. N. (1996). CR16, a novel proline-rich protein expressed in rat brain neurons, binds to SH3 domains and is a MAP kinase substrate. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 7(3), pp. 203–215.
23. Kropyvko, S., Gryaznova, T., Morderer, D., and Rynditch, A. (2017). Mammalian verprolin CR16 acts as a modulator of ITSN scaffold proteins association with actin. *Biochemical and biophysical research communications*, 484(4), pp. 813–819.
24. Meng, L., Rajmohan, R., Yu, S., and Thanabalu, T. (2007). Actin binding and proline rich motifs of CR16 play redundant role in growth of vrp1Delta cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 357(1), pp. 289–294.
25. Zettl, M., and Way, M. (2002). The WH1 and EVH1 domains of WASP and Ena/VASP family members bind distinct sequence motifs. *Current biology: CB*, 12(18), pp. 1617–1622.
26. Ho, H. Y., Rohatgi, R., Lebensohn, A. M., Le Ma, Li, J., Gygi, S. P., and Kirschner, M. W. (2004). Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell*, 118(2), pp. 203–216.

27. Salazar, M. A., Kwiatkowski, A. V., Pellegrini, L., Cestra, G., Butler, M. H., Rossman, K. L., Serna, D. M., Sondek, J., Gertler, F. B., and De Camilli, P. (2003). Tuba, a novel protein containing bin/amphiphysin/Rvs and Dbl homology domains, links dynamin to regulation of the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry*, 278(49), pp. 49031–49043.
28. Kropyvko, S. V. (2015). New partners of TKS4 scaffold protein. *Biopolymers and Cell*, 31(5), pp. 395–401.
29. Suetsugu, S., Banzai, Y., Kato, M., Fukami, K., Kataoka, Y., Takai, Y., Yoshida, N., and Takenawa, T. (2007). Male-specific sterility caused by the loss of CR16. *Genes to cells: devoted to molecular and cellular mechanisms*, 12(6), pp. 721–733.
30. Tsuboi S. (2006). A complex of Wiskott-Aldrich syndrome protein with mammalian verprolins plays an important role in monocyte chemotaxis. *Journal of immunology*, 176(11), pp. 6576–6585.
31. Nichols, N. R., Masters, J. N., and Finch, C. E. (1990). Changes in gene expression in hippocampus in response to glucocorticoids and stress. *Brain research bulletin*, 24(5), pp. 659–662.
32. Juszczak, G. R., and Stankiewicz, A. M. (2018). Glucocorticoids, genes and brain function. *Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry*, 82, pp. 136–168.
33. Padrick, S. B., and Rosen, M. K. (2010). Physical mechanisms of signal integration by WASP family proteins. *Annual review of biochemistry*, 79, pp. 707–735.
34. Грязнова, Т. (2019). *Комплекси білків родини інтерсектинів з верпролінами WIP і CR16 – компоненти апарату транспорту везикул та актинового цитоскелета*. Автореф. дис. канд. біол. наук. Київ. інститут молекулярної біології та генетики НАН України.

35. Campellone, K. G., and Welch, M. D. (2010). A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(4), pp. 237–251.
36. Bisson, N., James, D. A., Ivosev, G., Tate, S. A., Bonner, R., Taylor, L. and Pawson, T. (2011). Selected reaction monitoring mass spectrometry reveals the dynamics of signaling through the GRB2 adaptor. *Nature Biotechnology*, 29(7), pp. 653–658.
37. Hotulainen, P., and Hoogenraad, C. C. (2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *The Journal of cell biology*, 189(4), pp. 619–629.
38. Cingolani, L. A., and Goda, Y. (2008). Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(5), pp. 344–356.
39. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology*, 7(9), pp. 678–689.
40. Yamaguchi, H., and Condeelis, J. (2007). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(5), pp. 642–652.
41. GTEx Consortium (2020). The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6509), pp. 1318–1330.
42. Digre, A., and Lindskog, C. (2023). The human protein atlas-Integrated omics for single cell mapping of the human proteome. *Protein science : a publication of the Protein Society*, [online]. Available at <https://doi.org/10.1002/pro.4562>. [Accessed Apr. 2026].
43. Stuart, J. M., Segal, E., Koller, D., and Kim, S. K. (2003). A gene-coexpression network for global discovery of conserved genetic modules. *Science*, 302(5643), pp. 249–255.

44. Vogel, C., and Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature reviews. Genetics*, 13(4), pp. 227–232.
45. Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447, pp. 396–398.
46. Okrut, J., Prakash, S., Wu, Q., Kelly, M. and Taunton, J. (2015). Allosteric N-WASP activation by an inter-SH3 domain linker in Nck. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(47), pp. E6436–E6445.
47. Morris, H., Fort, L., Spence, H., Patel, R., Vincent, D., Park, J., Snapper, S., Carey, F., Sansom, O. and Machesky, L. (2018). Loss of N-WASP drives early progression in an Apc model of intestinal tumourigenesis. *The Journal of pathology*, 245(3), pp. 337–348.
48. Bird A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and development*, 16(1), pp. 6–21.
49. Feldman, B. J., and Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature reviews. Cancer*, 1(1), pp. 34–45.
50. Dent, E. W., and Gertler, F. B. (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*, 40(2), pp. 209–227.
51. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp. 646–674.
52. Hunter, T. (2000). Signaling--2000 and beyond. *Cell*, 100(1), pp. 113–127.
53. Mann, M., and Jensen, O. N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature biotechnology*, 21(3), pp. 255–261.
54. Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature reviews. Cancer*, 3(5), pp. 362–374.
55. Mayer B. J. (2006). Protein-protein interactions in signaling cascades. *Methods in molecular biology*, 332, pp. 79–99.
56. Buday, L., and Downward, J. (2007). Roles of cortactin in tumor pathogenesis. *Biochimica et biophysica acta*, 1775(2), pp. 263–273.

57. Birge, R. B., Kalodimos, C., Inagaki, F., and Tanaka, S. (2009). Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling. *Cell communication and signaling. CCS*, 7, p. 13.
58. Fruman, D. A., Chiu, H., Hopkins, B. D., Bagrodia, S., Cantley, L. C., and Abraham, R. T. (2017). The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*, 170(4), pp. 605–635.
59. Pawson T. (2004). Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell*, 116(2), pp. 191–203.
60. Thomas, S. M., and Brugge, J. S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annual review of cell and developmental biology*, 13, pp. 513–609.
61. Scott, J. D., and Pawson, T. (2009). Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. *Science*, 326(5957), pp.1220–1224.



3 *определенных* *группа,*
2009