

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ГУР'ЯНОВ ДМИТРО СЕРГІЙОВИЧ

УДК :577.2.575

ДИСЕРТАЦІЯ

**БЛОК VSR ЯК ПАРТНЕР КОМПОНЕНТІВ ЦИТОСКЕЛЕТА ТА
ВЕЗИКУЛЯРНОГО ТРАНСПОРТУ ПРИ VSR/ABL-ПОЗИТИВНІЙ
ХРОНІЧНИЙ МІСЛОЇДНІЙ ЛЕЙКЕМІЇ**

03.00.03 –молекулярна біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ Д.С. Гур'янов

Науковий керівник: **Телегєєв Геннадій Дмитрович**, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник.

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Гур'янов Д.С. Білок BCR як партнер компонентів цитоскелета та везикулярного транспорту при BCR/ABL-позитивній хронічній мієлоїдній лейкемії. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.03 «Молекулярна біологія». – Інститут молекулярної біології і генетики Національної Академії Наук України, Київ, 2021.

Онкогематологічні захворювання є одними з найпоширеніших видів раку. На відміну від солідних пухлин, що характеризуються гетерогенною популяцією клітин, для мієлопроліферативних захворювань характерне клональне розмноження онкотрансформованих клітини, що за рахунок мутацій здатні уникати апоптозу та мають селективну перевагу над диференційованими кровотворними клітинами.

Поширеним є розвиток онкогематологічного захворювання через хромосомні транслокації. Внаслідок транслокації можливе злиття двох генів, в результаті чого вони здатні дерегулювати сигнальні шляхи через набуття нехарактерних для них функцій: конститутивної експресії, тирозин-кіназної активності та нехарактерного для нормального білка розташування в клітині. Одним із перших випадків, коли наявність хромосомної транслокації вдалося пов'язати з онкогематологічним захворюванням було відкриття Філадельфійської хромосоми у 1960 році, коли виявили, що 22 хромосома лейкоцитів хворого на хронічну мієлоїдну лейкемію має коротше плече, ніж нормальна 22 хромосома. Філадельфійська хромосома виникає за рахунок реципрокної транслокації між 9 та 22 хромосомами $t(9;22)(q34;q11)$. Внаслідок цього ген Bcr, що знаходиться на 22 хромосомі, зливається з геном Abl, що знаходиться на 9 хромосомі. Гібридний білок BCR-ABL, що виникає внаслідок такого злиття, характеризується конститутивною тирозин-кіназною активністю, що забезпечується його ABL частиною. Це призводить до неконтрольованого

фосфорилування білків всередині клітини і як наслідок клітина перетворюється на злоякісну і втрачає здатність до диференціації.

В результаті різних ділянок розриву в гені *Bcr*, результатом транслокації можуть бути різні форми химерного білка – *Bcr-ABL_{p190}*, *Bcr-ABL_{p210}*, *Bcr-ABL_{p230}*. Вони відрізняються наявністю або відсутністю ділянки *Bcr*, що містить домени *PH* та *DH*. Ці три форми також викликають різні типи хвороб, коротка форма *p190* – гостру лімфобластну лейкемію, форма *p210* – хронічну мієлоїдну лейкемію, форма *p230* – хронічну нейтрофілну лейкемію. Таким чином вивчення функції цих доменів дозволять зрозуміти які молекулярні шляхи визначають конкретний фенотип захворювання.

Функція доменів гомології плекстрину, що зустрічаються в складі багатьох сигнальних білків в протеомі людини полягає в зв'язуванні ліпідів та білок-білкових взаємодіях. В попередніх дослідженнях за допомогою мас-спектрометрії було виявлено 23 потенційних кандидата на взаємодію з доменом *PH* білка *Bcr* серед білків клітинної лінії *K562*, яка походить від хворого на хронічну мієлоїдну лейкемію та містить перебудову *t(9;22)(q34;q11)*, експресуючи при цьому *Bcr-ABL_{p210}*. Одними з кандидатів на взаємодію є кортактин, що належить до родини білків регуляторів актинових філаментів, та β -тубулін, який є одним із двох гетеродимерів, що утворюють мікротрубочки.

Оскільки порушення функції цитоскелету часто пов'язані з онкотрансформацією та інвазивністю клітин, то важливо дослідити залучення *Bcr-ABL* та домену *PH* у реорганізацію цитоскелета та везикулярний транспорт, що і було метою цієї роботи.

Нами було визначено, що домен *PH* білка *Bcr* та повнорозмірний *Bcr* здатні співлокалізуватися у навколоядерній ділянці клітини з кортактином. Окрім цього вони співлокалізуються у примембранній ділянці в точках розгалуження актину, а також у місцях адгезії клітин до поверхні.

Ми також виявили, що *Bcr* та кортактин співлокалізується з клатрином, що є компонентом клатринових везикул. Нами було отримано субдифракційне зображення домену *PH* білка *Bcr*, а також зображення розподілу клатрину, *Bcr* та кортактину за допомогою мікроскопії надвисокої роздільної здатності *STED*.

Ми виявили, що домен PH та повнорозмірний BCR не співлокалізується з мікротрубочками, натомість ми виявили, що він присутній на центросомі разом з кортактином. Оскільки центросома є центром нуклеації мікротрубочок, то ми припускаємо що саме в цій ділянці може мати місце взаємодія між доменом PH та β -тубуліном. Центросома також є центром організації актину, згідно нещодавніх досліджень, тому одночасна присутність там BCR/ABL та кортактину може бути індикатором того, що активація кортактину відбувається за рахунок тирозин-кіназної частини ABL. Для перевірки цього припущення ми провели біоінформатичний аналіз сайтів фосфорилування і виявили, що 7 передбачених сайтів є спільними для ABL та SRC кінази, що є активатором кортактину. Ми вперше виявили, що саме PH домен забезпечує заякорювання BCR на центросомі. Ми вважаємо, що неконтрольоване фосфорилування кортактину може призводити в тому числі до порушення цілісності центросоми, що є однією із супутніх ознак клітин ХМЛ. Ми виявили, що Abl співлокалізується з центросомною ділянкою лише в присутності BCR, таким чином показавши, що саме BCR частина відповідає за нехарактерне для нормального ABL прицентросомне розташування.

Нами також було показана співлокалізація між BCR та кортактином у ядрі на завершальній стадії клітинного поділу, про що свідчить наявність перетяжки між ядрами. Ми припускаємо, що таким чином BCR та актин можуть забезпечувати розгалуження ядерного актину, яке необхідне для координованої зміни ядерної архітектури під час поділу.

В підсумку ми виявили, що білок BCR за рахунок домену PH може співлокалізуватися з кортактином та клатрином у різних компартментах клітини: примембранній, цитоплазматичній та навколоядерній ділянці. Ми припускаємо, що це є свідченням ролі домену PH білка BCR в системі ендосомального транспорту та сортиру, до якого залучені клатрин-опосередкований ендочиоз, утворення ранніх ендосом, транс-мережа Гольджі та центросома. Отримані дані можуть допомогти краще зрозуміти механізми патогенезу хронічної мієлоїдної лейкемії, а також бути підґрунтям для пошуку нових мішеней для терапії, що можуть стати альтернативою існуючого підходу у використанні інгібіторів тирозин-кіназної активності ABL, яка

часто призводить до виникнення резистентності та потребі розробки препаратів нового покоління.

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ), химерний білок Bcr-Abl, домен PH, кортактин, тубулін, клатрин-опосередкований ендоцитоз, центросома.

Список публікацій здобувача:

1. **Gurianov D.S.**, Antonenko S.V., Telegeev G.D. PH domain of BCR provides colocalization of full-length BCR with centrosome together with cortactin to facilitate actin-organizing function. *Biopolymers and cell*. 2021; 37(1): 3-13.

2. **Gurianov D.S.**, Antonenko S.V., Telegeev G.D Colocalization of BCR protein with clathrin, actin, and cortactin suggests its possible role in the regulation of actin branching and clathrin-mediated endocytosis. *Cytology and Genetics* 2021; 55(2): 152-161.

3. **Gurianov D.S.**, Antonenko S.V., Telegeev G.D Nuclear localization of BCR and cortactin indicates their potential role in regulation of actin branching in nucleus. *Experimental Oncology* 2021; 43(1): 73-76.

4. Антоненко С, Гур'янов Д, Кравчук І, Телегєєв Г. Аналіз клітинної локалізації PH домена Bcr-Abl з білком USP1 та розробка програми для оцінки їх сайтів фосфорилування. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2018; 22: 90-95.

5. Антоненко С, Кравчук І, Гур'янов Д, Телегєєв Г. Білки партнери PH домену протеїна Bcr-Abl: створення генетичних конструкцій для виявлення молекулярних особливостей розвитку ХМЛ. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017; 20: 47-52.

6. **Gurianov D**, Antonenko S, Telegeev G Colocalization of cortactin and PH domain of BCR in HEK293T cells and its potential role in cell signaling *Biopolymers and cell*. – 2016; 32(1): 26-33.

7. **Гур'янов Д**, Лисецька Т, Кравчук І, Антоненко С, Телегеев Г.Д. Роль домену PH білка BCR у клітинних процесах, що визначають фенотип Ph'-позитивних мієлопроліферативних захворювань. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2014; 15: 44-48.

8. Лисецька Т.Ю., Кравчук І.В., **Гур'янов Д.С.**, Телегеев Г.Д., Дибков М.В. Білки, що взаємодіють з PH доменом BCR-ABL, та їхня роль у формуванні пухлинного фенотипу при розвитку мієлопроліферативних захворювань. Досягнення і проблеми генетики, селекції і біотехнології, ЛОГОС, 2012; 3: 390-394.

9. **Gurianov D.S.**, Sadytska N.O. Telegeev G.D. Intracellular localization of BCR, actin and clathrin determined by fluorescent microscopy XIV IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists Abstract Book. 2020, p 16.

10. **D. Gurianov**, S. Antonenko, G. Telegeev Creating genetic constructs for determining spatio-temporal distribution of cortactin and the PH domain of BCR in mammalian cells Exp Oncol 2018, 40 (2): 159-160.

11. **Gurianov D.**, Telegeev G. Super-resolution imaging of intracellular distribution of PH domain of BCR in HEK293T cells BASEL LIFE 2018. Abstract Book. - P64.

12. **Gurianov D**, Antonenko S, Telegeev G. Possible role of PH domain of Bcr in molecular pathways that determine the phenotype of myeloproliferative disorder in Bcr-Abl positive leukemias. LIMSC – 10th Leiden International (Bio) Medical Student Conference Abstract book; 2017, p 84.

13. Antonenko S, **Gurianov D**, Kravchuk I, Telegeev G. Role of USP1, CORTACTIN and HSP27 proteins in molecular mechanisms that affect CML development. International Scientific Conference Normal and cancer stem cells: discovery, diagnosis and therapy; 2017 October 5–6, Kyiv, Ukraine.

14. **Gurianov D**, Antonenko S, Kravchuk I, Telegeev G. Colocalization analysis shows that PH domain of BCR may play role in proteasomal degradation and clathrin-mediated endocytosis through proteins CTTN and USP1, but unlikely to influence cell adhesion. 41th FEBS congress; 2016 September 3-8, Kuşadası, Turkey.

15. Антоненко С, **Гурянов Д**, Кравчук І, Телегеев Г. Колокалізація USP1 і CTTN із PH доменом онкобілка та їх роль у розвитку ХМЛ. XIII з'їзд онкологів та радіобіологів України; 2016 травень 26-28, Київ, Україна. 189-190

16. **Gurianov, D. S.**, Antonenko, S. V., Telegeev, G. D. Colocalization analysis shows the role of PH domain of BCR in proteasomal degradation and clathrin-mediated endocytosis *Acta Biochimica Polonica*, 2016; 63: 60

17. **Gurianov D. S.**, Antonenko S. V., Kravchuk I.V., Telegeev G. D. Cellular localization of b-tubulin, cortactin and PH domain of BCR, and their potential role in signalling pathways and clathrin-mediated endocytosis 12th International Congress of Cell Biology Abstract Book. 2016; 154

18. **Gurianov D.S.**, Kravchuk I.V., Maliuta O.V., Dybkov M.V., Telegeev G.D. Role of PH domain of BCR/ABL fusion protein in cytoskeleton remodeling *Biopolymers and Cell*, 2013; 29 Special Issue: 6

19. Тютюнникова А.П., Лисецька Т.Ю., **Гур'янов Д.С.**, Кравчук І.В., Телегеев Г.Д. Структурно-функціональні особливості химерних білків BCR/ABL і їх роль в патогенезі PH-позитивних лейкозів *Актуальні питання гематології та трансфузіології, АТІКА*, 2011; 143-144.

SUMMARY

Gurianov D.S. BCR protein as partner of cytoskeleton and vesicular transport components in chronic myelogenous leukemia. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 03.00.03 "Molecular Biology". – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

Oncohematological diseases are one of the most common types of cancer. Unlike solid tumors, which are characterized by a heterogeneous population of cells, myeloproliferative diseases are characterized by clonal proliferation of oncotransformed cells, which due to mutations are able to avoid apoptosis and have a selective advantage over differentiated hematopoietic cells.

Quite common is the development of oncohematological disorder due to chromosomal translocation. Translocation results in fusion of two genes, leading to deregulation of signaling pathways due to the acquisition of atypical functions: constitutive expression, tyrosine kinase activity and abnormal protein localization within the cell. One of the first instances of chromosomal translocation to be associated with oncohematological disease was the discovery of the Philadelphia chromosome in 1960, when it was found that the 22 chromosome in leukocytes of a patient with chronic myeloid leukemia had a shorter arm than the normal 22 chromosome. The Philadelphia chromosome arises due to t(9; 22) (q34; q11) reciprocal translocation between 9 and 22 chromosomes. As a result, Bcr gene on chromosome 22 is fused to the Abl gene on chromosome 9. BCR-ABL hybrid protein resulting from such fusion is characterized by the constitutive tyrosine kinase activity provided by its ABL portion. This leads to uncontrolled phosphorylation of proteins inside the cell and as a result the cell becomes malignant and loses the ability to differentiate.

Because of different breakpoints in the Bcr gene, translocation can give rise to different types of chimeric protein – BCR-ABL_{p190}, BCR-ABL_{p210}, BCR-ABL_{p230}. They differ in the presence or absence of a BCR region containing the PH and DH domains. These three forms also cause different types of disorders, the short type p190 - acute lymphoblastic leukemia,

type p210 - chronic myeloid leukemia, type p230 - chronic neutrophilic leukemia. Thus, the study of the function of these domains will help to understand which molecular pathways determine the specific phenotype of the disease.

Functions of the pleckstrin homology domains found in many signaling proteins in the human proteome are lipid binding and protein-protein interactions. In previous studies, mass spectrometry identified 23 potential candidates for interaction with the PH domain of the BCR among the proteins of the K562 cell line, which originates from a patient with chronic myeloid leukemia and contains t(9; 22) (q34; q11) rearrangement, expressing BCR-ABL_{p210}. One of the candidates for the interaction is cortactin, which belongs to protein family of actin regulators, and β -tubulin, which is one of the two heterodimers that form microtubules.

Because cytoskeletal dysfunction is often associated with oncotransformation and cell invasiveness, it is important to investigate the involvement of BCR-ABL and PH domain in cytoskeletal reorganization and vesicular transport, which was the aim of this study.

We determined that PH domain of BCR protein and full-length BCR are able to colocalize with cortactin in the perinuclear region of the cell. In addition, they are colocalized in the perimembrane region at the points of actin branching and in the sites of cell adhesion to surface.

We also found that BCR and cortactin colocalize with clathrin, which is a component of clathrin-coated vesicles. We obtained a subdiffraction image of PH domain of BCR, as well as an image of distribution of clathrin, BCR and cortactin using STED super-resolution microscopy.

We found that PH domain and full-length BCR do not colocalize with microtubules, instead we found that it is present on the centrosome along with cortactin. Since the centrosome is the nucleation center of microtubules, we suggest that it is in this region that the interaction between the PH domain and β -tubulin may take place. According to recent studies, centrosome is also the actin-organizing center, so the simultaneous presence of BCR / ABL and cortactin may be an indication that cortactin is activated by tyrosine kinase activity of ABL part. To test this hypothesis, we performed a bioinformatic analysis of phosphorylation sites and found that the 7 predicted sites are common to ABL and cortactin activator - SRC kinase. For the first time it is shown that PH domain provides anchoring of

BCR to the centrosome. We believe that uncontrolled phosphorylation of cortactin can lead to disruption of centrosome integrity, which is one of the distinct features of CML cells. We found that Abl colocalizes with the centrosomal region only in the presence of BCR, thus showing that it is the BCR part that is responsible for the atypical pericentrosomal localization ABL.

We also showed colocalization between BCR and cortactin in the nucleus at the final stage of cell division, characterized by the presence of contractile ring between the nuclei. We hypothesize that BCR and actin may thus provide the branching of nuclear actin that is required for a coordinated change in the nuclear architecture during cell division.

To conclude, we found that BCR can colocalize with cortactin and clathrin in different compartments of the cell due PH domain: perimembrane, cytoplasmic and perinuclear region. We hypothesize that this demonstrates the role of PH domain of BCR domain in endosomal trafficking and sorting system, which involves clathrin-mediated endocytosis, early endosome formation, Trans-Golgi network, and centrosome. These data may aid in better understanding of pathogenesis mechanisms of chronic myeloid leukemia and provides background for new therapeutic targets that may be an alternative to the existing approach of using tyrosine-kinase inhibitors of ABL, which often lead to resistance and requirement to develop next generation of drugs.

Key words: chronic myeloid leukemia (CML), chimeric protein Bcr-Abl, PH domain, cortactin, tubulin, clathrin-mediated endocytosis, centrosome.

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

1. **Gurianov D.S.**, Antonenko S.V., Telegeev G.D. PH domain of BCR provides colocalization of full-length BCR with centrosome together with cortactin to facilitate actin-organizing function. *Biopolymers and cell.* 2021; 37(1): 3-13.
2. **Gurianov D.S.**, Antonenko S.V., Telegeev G.D Colocalization of BCR protein with clathrin, actin, and cortactin suggests its possible role in the regulation of actin branching and clathrin-mediated endocytosis. *Cytology and Genetics* 2021; 55(2): 152-161.

3. **Gurianov D.S.**, Antonenko S.V., Telegeev G.D Nuclear localization of BCR and cortactin indicates their potential role in regulation of actin branching in nucleus. *Experimental Oncology* 2021; 43(1): 73-76.

4. Antonenko S, **Gurianov D**, Kravchuk I, Telegeev G. Analysis of cellular localization of PH domain of Bcr-Abl with USP1 protein and development of software for analysis of its' phosphorylation sites. *Factors of experimental evolution of organisms*. 2018; 22: 90-95.

5. Antonenko S, Kravchuk I, **Gurianov D**, Telegeev G. Protein partners of PH domain of Bcr-Abl protein: creation of genetic constructs for detection molecular features of CML development. *Factors of experimental evolution of organisms*. 2017; 20: 47-52.

6. **Gurianov D**, Antonenko S, Telegeev G Colocalization of cortactin and PH domain of BCR in HEK293T cells and its potential role in cell signaling *Biopolymers and cell*. – 2016; 32(1): 26-33.

7. **Gurianov D**, Lysetska T, Kravchuk I, Antonenko S, Telegeev GD Role PH domain of the BCR protein in cellular processes that determine the phenotype of Ph'-positive myeloproliferative disorders. *Factors of experimental evolution of organisms*. 2014; 15: 44-48.

8. Lysetska T.Yu., Kravchuk IV, **Gurianov DS**, Telegeev GD, Dybkov MV Proteins that interact with PH domain of BCR-ABL and their role in the formation of cancer phenotype during development of myeloproliferative diseases. *Achievements and problems of genetics, selection and biotechnology, LOGOS*, 2012; 3: 390-394.

9. **Gurianov D.S.**, Sadytska N.O. Telegeev G.D. Intracellular localization of BCR, actin and clathrin determined by fluorescent microscopy XIV IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists Abstract Book. 2020, p 16.

10. **D. Gurianov**, S. Antonenko, G. Telegeev Creating genetic constructs for determining spatio-temporal distribution of cortactin and the PH domain of BCR in mammalian cells *Exp Oncol* 2018, 40 (2): 159-160.

11. **Gurianov D.**, Telegeev G. Super-resolution imaging of intracellular distribution of PH domain of BCR in HEK293T cells *BASEL LIFE* 2018. Abstract Book. - P64.

12. **Gurianov D**, Antonenko S, Telegeev G. Possible role of PH domain of Bcr in molecular pathways that determine the phenotype of myeloproliferative

disorder in Bcr-Abl positive leukemias. LIMSC – 10th Leiden International (Bio) Medical Student Conference Abstract book; 2017, p 84.

13. Antonenko S, **Gurianov D**, Kravchuk I, Telegeev G. Role of USP1, CORTACTIN and HSP27 proteins in molecular mechanisms that affect CML development. International Scientific Conference Normal and cancer stem cells: discovery, diagnosis and therapy; 2017 October 5–6, Kyiv, Ukraine.

14. **Gurianov D**, Antonenko S, Kravchuk I, Telegeev G. Colocalization analysis shows that PH domain of BCR may play role in proteasomal degradation and clathrin-mediated endocytosis through proteins CTTN and USP1, but unlikely to influence cell adhesion. 41th FEBS congress; 2016 September 3-8, Kuşadası, Turkey.

15. Antonenko S, **Gurianov D**, Kravchuk I, Telegeev G. Colocalization of USP1 and CTTN with PH domain of oncoprotein and their role in the development of CML. XIII Congress of oncologists and radiobiologists of Ukraine; May 26, 2016, Kyiv, Ukraine. 189-190

16. **Gurianov, D. S.**, Antonenko, S. V., Telegeev, G. D. Colocalization analysis shows the role of PH domain of BCR in proteasomal degradation and clathrin-mediated endocytosis *Acta Biochimica Polonica*, 2016; 63: 60

17. **Gurianov D. S.**, Antonenko S. V., Kravchuk I.V., Telegeev G. D. Cellular localization of β -tubulin, cortactin and PH domain of BCR, and their potential role in signalling pathways and clathrin-mediated endocytosis 12th International Congress of Cell Biology Abstract Book. 2016; 154

18. **Gurianov D.S.**, Kravchuk I.V., Maliuta O.V., Dybkov M.V., Telegeev G.D. Role of PH domain of BCR/ABL fusion protein in cytoskeleton remodeling *Biopolymers and Cell*, 2013; 29 Special Issue: 6

19. Tyutyunnykova AP, Lysetskaya TY, **Gurianov DS**, Kravchuk IV, Telegeev GD Structural and functional features of BCR / ABL chimeric proteins and their role in the pathogenesis of Ph'-positive leukemias *Current issues of hematology and transfusiology, ATIKA*, 2011, p. 143-144.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	16
ВСТУП	19
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	25
1.1. Хромосомні транслокації та їх зв'язок з онкологічними захворюваннями.	25
1.2. Характеристика та функції гену <i>bcr</i> людини.	27
1.3. Характеристика та функції гену <i>abl1</i> людини.	31
1.4. Роль химерних білків BCR/ABL та ABL/BCR в розвитку різних форм лейкемії.	32
1.5. Роль PH домену білка BCR/ABL у молекулярному патогенезі хронічної мієлоїдної лейкемії.	35
1.6. Структура та функції мікротрубочок та різних типів тубуліну.	37
1.7. Характеристика кортактину.	38
1.8. Структурна характеристика білку клатрину та його взаємодія із адапторними протеїнами.	40
1.9. Методи вивчення білок-білкових взаємодій та внутрішньоклітинної локалізації білків.	42
1.10. Порушення функціонування цитоскелету та везикулярного транспорту при онкогематологічних захворюваннях.	44
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	47
2.1. Розчини, використані в роботі.	47
2.2. Обладнання, використане в роботі.	48
2.3. Ферменти, використані в роботі.	48
2.4. Антитіла та барвники, що використовувалися в роботі.	49
2.5. Приготування компетентних клітин <i>E.coli</i>	49
2.6. Вектори, клітинні лінії ссавців та штами <i>E.coli</i> .	50
2.7. Створення генетичних конструкцій.	50

2.8. Виділення плазмід за допомогою лужного лізису.	51
2.9. Виділення плазмід за допомогою неіонних детергентів.	52
2.10. Розрізання ДНК ендонуклеазами рестрикції.	53
2.11. Обробка фрагментів ДНК після розрізання ендонуклеазами рестрикції.	53
2.12. Лігування фрагментів ДНК.	53
2.13. Трансформація компетентних клітин <i>E. coli</i> .	54
2.14. Очищення плазмідної ДНК.	54
2.15. Очищення ДНК на колонках з фільтрами із скловолокна.	55
2.16. Електрофорез ДНК в агарозному гелі.	56
2.17. Культивування клітин ссавців.	56
2.18. Трансфекція клітин ссавців.	56
2.19. Фіксація клітин ссавців для флуоресцентної мікроскопії.	57
2.20. Обробка клітин ссавців антитілами та барвниками для використання у флуоресцентній мікроскопії.	58
2.21. Флуоресцентна мікроскопія.	59
2.22. Кількісний аналіз та обробка зображень.	61
2.23. Дизайн алюмінієвої камери для мікроскопії живих клітин.	61
2.24. Біоінформатичний аналіз сайтів фосфорилування кортактину.	62
2.25. Статистичний аналіз.	62
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	63
3.1. Створення генетичних конструкцій для визначення внутрішньоклітинної локалізації домену РН білка BCR та кортактину за допомогою флуоресцентної мікроскопії.	63
3.2. Біоінформатичний аналіз сайтів фосфорилування кіназою ABL тирозинових залишків в складі кортактину.	65
3.3. Розробка мікрослайдів для мікроскопії живих клітин.	67
3.4. Залучення білка BCR та домену РН BCR до розгалуження актину та клатрин-опосередкованого ендоцитозу.	70

3.4.1. Співлокалізація кортактину та домену PH BCR у клітинах НЕК293Т.	70
3.4.2. Співлокалізація між кортактином, клатрином та BCR у клітинах НЕК293Т.	71
3.4.3. Співлокалізація кортактину, клатрину, та BCR у живих клітинах НЕК293Т.	73
3.4.4. Ультроструктурні особливості внутрішньоклітинного розподілу домену PH в фіксованих клітинах НЕК293Т.	75
3.4.5. Потрійна співлокалізація між клатрином, BCR та кортактином виявлена за допомогою мікроскопії надвисокої роздільної здатності.	76
3.4.6. Співлокалізація білка BCR з точками розгалуження актинових філаментів.	78
3.5. Співлокалізація білка BCR з кортактином у ядрі клітини.	85
3.6. Співлокалізація білка BCR та домену PH BCR з тубуліном та центром організації мікротрубочок.	87
3.6.1. Роль домену PH у співлокалізації BCR з кортактином у центросомі.	87
3.6.2. Співлокалізація онкобілка BCR/ABL з γ -тубуліном в навколоядерній ділянці розгалуження актину.	91
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	95
ВИСНОВКИ	109
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	111
ДОДАТОК А	133

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГЛЛ	Гостра лімфобластна лейкемія
кДа	Кілодальтон
ПЛР	Полімеразно-ланцюгова реакція
ХМЛ	Хронічна мієлоїдна лейкемія
ЧПК	Числове програмне керування
ABL	Лейкемія Абельсона
ANI-1	Хелперний сайт інтеграції Абельсона 1
APPL1	Адапторний білок, що взаємодіє з доменом PH та лейцинову застібкою 1 через фосфотирозин
Actp	Актин-подібний білок
BCR	Ділянка кластерів розриву
CAD	Система автоматизованого проектування
CHC	Важкий ланцюг клатрину
chTOG	Рецептор транспортера спарених опсина та G-білка людини
CLASP	Клатрин-асоційовані сортувальні білки
CLC	Легкий ланцюг клатрину
CTTN	Кортактин
DABCO	1,4-діазобіцило[2.2.2]октан
DAPI	2-(4-амідінофеніл)-6-індолкарбомідін дигідрохлорид
DH	Домен гомології до Dbl
DMEM	модифіковане Дульбекко середовище Ігла

ECFP	Покращений ціановий флуоресцентний білок
EGFP	Покращений зелений флуоресцентний білок
FITC	Тіоціанат флуоресцеїну
GAP	Білок активатор ГТФаз
GDI	Інгібітор дисоціації гуанозину
GEF	Фактор обміну гуанінових нуклеотидів
HEPES	4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфонова кислота
hVPS34	Фосфатидил-інозитол 3 кіназа С3С
M-bcr	Головна ділянка кластерів розриву
m-bcr	Мінорна ділянка кластерів розриву
MT	Мікротрубочки
mTagRFP	Мономерний червоний флуоресцентний білок
NFκβ	Ядерний фактор κβ
NLS	Сигнальна послідовність ядерної локалізації
PBS	Фосфатно-сольовий буфер
PCM1	Перицентріолярний матеріал 1
PEG	Поліетиленглікол
PEI	Поліетиленімін
Ph'	Філадельфійська хромосома
PH	Домен гомології плекстрину
PICALM	Фосфатидилінозитол-зв'язувальний лімфоїдний міелоїдний білок збирання клатрину
PIP	Фосфатидил-інозитол фосфат

PKC	Протеїн кіназа C
RPMI	середовище Інституту Розвел Парк Меморіал
SH	Домен гомології SRC
SiR	Родамін кремнію
SNX15	Сортуючий нексин-15
STED	Стимульоване виснаження випромінювання
STORM	Мікроскопія стохастичної оптичної реконструкції
TACC3	Трансформуючий ксильний скручено-спіралевмісний білок 3
TBST	Забуферений сольовий розчин Тріс + Tween 20
WASH	WASP гомолог
WASP	білок синдрому Віскотта-Олдрича
WIP	білок, що взаємодіє з WAS/WASL
μ-bcr	мікро ділянка кластерів розриву

ВСТУП

Хромосомні транслокації призводять до комплексних порушень функції клітини, в тому числі і до онкогенної трансформації. Вперше виявити причинно-наслідковий зв'язок між хворобою та специфічним порушенням вдалось виявити на прикладі Філадельфійської хромосоми, що є наслідком реципрокної транслокації між довгими плечима 9 та 22 хромосоми (1). Внаслідок цього відбувається злиття генів *bcr* та *abl* (2).

Експресія злитого гена *bcr/abl* результує в утворення химерного білка BCR/ABL, що призводить до онкогенної трансформації гемопоетичної клітини (3). При вищеназваній хромосомній транслокації розрив відбувається в різних ділянках гена *bcr*, що названі *M-bcr*, *m-bcr* та μ -*bcr*. Як наслідок, утворюються злиті гени різної довжини, а їх продукти мають різну молекулярну масу. Відповідно до молекулярної маси своїх продуктів, злиті гени позначаються *bcr/abl*_{p190}, *bcr/abl*_{p210} та *bcr/abl*_{p230}. Кожен з них асоційований з певною формою лейкемії: *bcr/abl*_{p190} – з гострою лімфобластною лейкемією, *bcr/abl*_{p210} – з хронічною мієлоїдною лейкемією, *bcr/abl*_{p230} – з хронічною нейтрофільною лейкемією (4). Продукти цих генів відрізняються наявністю чи відсутністю певних функціональних доменів білка BCR. Так, в складі BCR/ABL_{p210} містяться PH, DH домени, що відсутні в складі BCR/ABL_{p190} (5,6). В попередніх дослідженнях за допомогою мас-спектрометрії було виявлено, що PH домен білка BCR здатен взаємодіяти з рядом клітинних білків. Серед потенційних кандидатів на - взаємодію були білки кортактин та β -тубулін.

Кортактин за нормальних умов бере участь в ініціації цитоскелетних перебудов, зокрема, при ендоцитозі, формуванні ламелоподій і подосом, спрямуванні росту аксонів, транспортуванні везикул від комплексу Гольджі (7–9). Проте при розвитку неопластичних новоутворень кортактин сприяє збільшенню агресивності пухлини, що проявляється в активному метастазуванні у віддалені осередки пухлинного процесу (10,11). Агресивність пухлини зростає за рахунок формування інвадоподій – актин-збагачених мембранних виростів, які характеризуються високою адгезивністю та здатні руйнувати позаклітинний матрикс завдяки синтезу матриксних

металопротеаз (12). Високу концентрацію кортактину було зафіксовано при карциномі молочної залози, меланомі, гліобластомі, колоректальному раку та інших видах онкологічних захворювань (13). Окрім цього, підвищена експресія кортактину корелює з підвищенням рівня хемотаксису та резистентністю ряду онкогематологічних захворювань до терапії, що є підставою для несприятливого прогнозу (14).

Білок β -тубулін є компонентом мікротрубочок, залучених у процеси клітинної міграції, внутрішньоклітинного транспорту та регуляції мітотичних поділів. При злоякісній трансформації порушується стабільність мікротрубочок, змінюється рівень експресії гена, що кодує β -тубулін, а сам білковий продукт зазнає нетипових посттрансляційних модифікацій. Такі патологічні зміни корелюють із важким перебігом злоякісного захворювання, низькою виживаністю пацієнтів та стійкістю до хіміотерапевтичних препаратів (15).

Наразі існування взаємозв'язку між патогенезом онкологічних захворювань і регуляторами цитоскелетних перебудов не викликає сумнівів (16,17). Точні механізми такого зв'язку потребують детальнішого вивчення, особливо, беручи до уваги те, що вони можуть варіювати для кожного різновиду онкологічного захворювання. Вивчення можливості залучення онкобілка BCR/ABL за рахунок домену PH у процеси везикулярного транспорту та реорганізацію цитоскелета, які регулюються кортактином та β -тубуліном, можуть мати ключове значення для з'ясування механізмів онкогенної трансформації гемопоетичних клітин. Отримані нові дані можуть бути основою для розробки альтернативних підходів до діагностики та терапії хронічної мієлоїдної лейкемії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась в рамках бюджетних тем: «Роль Vcr-асоційованих білків у сигнальних шляхах при мієлопроліферативних захворюваннях» (номер державної реєстрації – 0108U008527, 2009-2013 рр.), «Роль різних форм білка Vcr-Abl в сигнальних шляхах та формування пухлинного фенотипу при

мієлопроліферативних неоплазмах» (номер державної реєстрації – номер державної реєстрації – 0113U004305, 2014-2018 рр.), «Ендогенні чинники розвитку мієлопроліферативних пухлин та раку передміхурової залози» (номер державної реєстрації – 0119U100821, 2019-2023 рр.), дослідницького гранту I-NEXT “Spatial distribution of BCR-ABL, cortactin, clathrin and β -tubulin on subdiffraction level and their role in clathrin-mediated endocytosis” в рамках програми Горизонт 2020 (project id: 8230).

Мета та завдання дослідження. Метою даної роботи було визначити участь білка BCR та домену PH BCR у розвитку BCR-ABL-позитивної хронічної мієлоїдної лейкемії при залученні до процесів везикулярного транспорту та реорганізації цитоскелету. Для досягнення цієї мети було поставлено наступні завдання:

1. Створити генетичні конструкції для еукаріотичної експресії кортактину та домену PH білка BCR, що будуть використані у флуоресцентній мікроскопії.
2. Провести біоінформатичний пошук сайтів фосфорилування кортактину ABL кіназою для передбачення можливості активації кортактину кіназою ABL.
3. Розробити камеру для візуалізації живих клітин на конфокальному мікроскопі, що мала б переваги над існуючими аналогами.
4. Визначити внутрішньоклітинну локалізацію повнорозмірного білка BCR та домену PH та визначити їх залучення до реорганізації актину під час клатрин-опосередкованого ендоцитозу за участі кортактину.
5. Визначити можливість ядерної співлокалізації між кортактином та BCR.
6. Визначити особливості внутрішньоклітинної локалізації білка BCR та тубуліну.

Об’єкт дослідження. Об’єктом дослідження є химерний онкобілок BCR-ABL, повнорозмірний BCR та домен PH BCR.

Предмет дослідження. Предметом дослідження є залучення домену PH білка BCR та повнорозмірного BCR у реорганізацію цитоскелету та везикулярний транспорт.

Методи дослідження. Полімеразна ланцюгова реакція, клонування фрагментів ДНК в генетичні конструкції для еукаріотичної експресії цільових послідовностей, трансформація клітин *E.coli*, виділення та очищення плазмідної ДНК, культивування та трансфекція клітин ссавців, фіксація та імунозбарвлення клітин ссавців,

флуоресцентна конфокальна мікроскопія живих та фіксованих клітин ссавців, флуоресцентна мікроскопія надвисокої роздільної здатності STED, проектування у програмі FreeCAD, обробка та кількісний аналіз зображень, деконволюція, біоінформатичний аналіз сайтів фосфорилування.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше було отримано зображення надвисокої роздільної здатності домену PH білка BCR в клітинах ссавців. Показано, що домен PH та повнорозмірний білок BCR здатні співлокалізуватися з кортактином та клатрином. Продемонстровано, що білок BCR локалізується в ділянках розгалуження актину разом з кортактином. Виявлено, що домен PH білка BCR необхідний для його співлокалізації з центросомою та показана його спільна локалізація з кортактином в центросомальній ділянці. Показана співлокалізація між білком BCR та кортактином в ядрі клітини на термінальній стадії поділу клітини. Вперше отримано зображення надвисокої роздільної здатності комплексу між BCR, кортактином та клатрином. На основі біоінформатичного пошуку сайтів фосфорилування кортактину кіназою ABL, передбачено можливість активації кортактину кіназою ABL.

Практичне значення одержаних результатів. Визначення сигнальних процесів до яких залучений білок BCR/ABL_{p210} за рахунок домена PH є важливим розвитком для розуміння патогенезу онкогематологічних захворювань, асоційованих з білками BCR/ABL_{p210} та BCR/ABL_{p190}. Визначення кортактину як потенційної мішені фосфорилування з боку Abl може слугувати базою для альтернативних до інгібіторів тирозин-кіназної активності підходів у лікуванні ХМЛ. Виявлення залучення домену PH та білка BCR у розгалуження актину, клатрин-опосередкований ендцитоз та співлокалізацію з центросомою сприяє розумінню можливої ролі BCR/ABL в процесах онкогенної трансформації, оскільки порушення реорганізації актину та цілісності центросом корелює з онкогенністю та інвазивністю клітин. Розроблена та виготовлена алюмінієва камера для мікроскопії живих клітин є зручною, багаторазовою та недорогою альтернативою комерційним зразкам, що потребують спеціального предметного столику на мікроскопі та не здатні запобігти випаровуванню поживного середовища.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно було проаналізовано літературу та сплановано експеримент. Підбір праймерів, створення генетичних конструкцій, виділення ДНК, дизайн та анодування алюмінієвої камери, культивування клітин, фіксація та імунозабарвлення клітин ссавців було виконано автором самостійно. Отримання зображень з флуоресцентного конфокального мікроскопа Carl Zeiss LSM 510 Meta було проведено спільно з с.н.с. С.О. Карахімом на базі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна, отримання зображень з флуоресцентного мікроскопа надвисокої роздільної здатності Leica SP8 STED 3D було проведено спільно із співробітником центру передової світлової мікроскопії Марко Лампе, на базі ЄМБЛ, Гайдельберг, Німеччина. Обробка та аналіз зображень проведені автором самостійно. Автор висловлює подяку науковому керівнику Телегєєву Г.Д. за допомогу в розробці стратегії досліджень, аналізі, узагальненні та представленні результатів експериментів у наукових публікаціях. Автор щиро вдячний Кирилу Пиршеву, Марії Рибак, Вікторії Косач, Ігорю Кравчуку за допомогу в інтерпретації та аналізі отриманих результатів.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були обговорені на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях: конференція молодих вчених ІМБГ (Україна, Київ, 2012), конференція молодих вчених ІМБГ (Україна, Київ, 2013), Parnas conference «Molecules in Living Cells and in Innovative Medicine» (Poland, Wrocław, 2016), 12th International Congress of Cell Biology (Czech Republic, Prague, 2016), 41th FEBS congress (Turkey, Kuşadası, 2016), III з'їзд онкологів та радіобіологів (Україна, Київ, 2016), International Scientific Conference, LIMSC – 10th Leiden International (Bio) Medical Student Conference (Netherlands, Leiden 2017), Basel Life 2018 (м. Базель, Швейцарія), XIV Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine (Ukraine, Kyiv, 2020).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 8 статей у наукових фахових журналах та тези 11 доповідей у збірниках матеріалів з'їздів та конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків та списку використаних джерел.

Дисертацію викладено на 135 сторінках стандартного машинопису. Вона містить 26 рисунків. Список використаної літератури охоплює 201 найменування.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Хромосомні транслокації та їх зв'язок з онкологічними захворюваннями.

Порушення структури хромосом при злоякісній трансформації клітин та тканин є відомим явищем. Вони можуть мати як специфічний так і неспецифічний характер. До подібних порушень належать точкові мутації, делеції, інверсії, дуплікації та транслокації. Внаслідок таких аберацій з'являються білки з онкогенними властивостями або втрачаються білки-супресори онкогенезу. Специфічні хромосомні порушення можуть впливати на механізми репарації ДНК та викликати вторинні пошкодження, які надаватимуть клітинам додаткових генотипових та фенотипових ознак, збільшуючи їх злоякісність (18,19).

Хромосомна транслокація – це явище, при якому відбувається обмін плечима між негомологічними хромосомами. Це може призвести до злиття генів, які за нормальних умов локалізуються на різних хромосомах. Зустрічаються реципрокні (неробертсонівські), або нереципрокні (робертсонівські), рівноважні та нерівноважні хромосомні транслокації. При рівноважній транслокації відбувається обмін плечима хромосом без втрати або набуття генетичного матеріалу, при нерівноважній, в свою чергу, має місце делеція або дуплікація. Злиття генів, що відбулося внаслідок транслокації, призводить до синтезу химерних білків, здатних порушувати нормальний перебіг фізіологічних процесів в клітині та впливати на ключові сигнальні шляхи. Це може призвести до неконтрольованої проліферації, втрати здатності до диференціювання та в подальшому викликати онкогенну трансформацію (3,20).

У 1973 році Rowley і співавт. було показано, що Філадельфійська хромосома є результатом реципрокної транслокації між довгими плечима 9 хромосом 9 і 22, в точках розриву q34 та q11 відповідно (рис. 1.1) (21). В результаті відбувається злиття генів *bcr* та *abl*. Відповідно, утворюються два варіанти злитого гена – *bcr/abl* на 22 хромосомі та *abl/bcr* на 9 хромосомі.

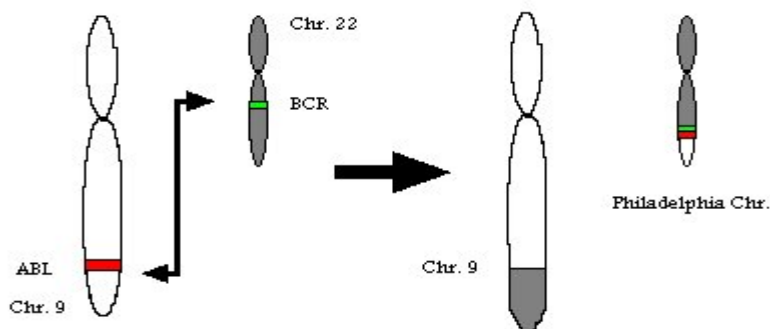


Рис. 1.1. Хромосомна транслокація $t(9:22)(q34;q11)$ з утворенням Філадельфійської хромосоми. Адаптовано до (22).

Подібна хромосомна аберація призводить до розвитку мієлопроліферативного захворювання, що характеризується зупинкою диференціації кровотворних клітин мієлоїдної лінії на ранніх етапах їх дозрівання. Хвороба має три стадії – хронічну, фазу прискорення та бластної кризи. Хронічна стадія зазвичай проходить без симптомів. В цей час відбувається клональна експансія трансформованих клітин. Середня тривалість хронічної фази – 3-4 роки. На стадії прискорення відбувається накопичення вторинних генетичних порушень, що призводить до збільшення селезінки та підвищення кількості мієлобластів в крові до 18-20 %. Бластна фаза за симптомами нагадує гостру мієлоїдну лейкемію і характеризується розвитком хлоромі, наявністю великих кластерів бластних клітин та зростання кількості мієлобластів до більш ніж 30 % від загальної кількості кровотворних клітин (22,23). Окрім цього втрачається здатність гемопоетичних стовбурових клітин до диференціації (3).

1.2. Характеристика та функції гену *bcr* людини.

Ген *bcr* знаходиться на 22 хромосомі в ділянці q11. Таку назву він отримав через те, що розрив при хромосомній транслокації відбувається у різних точках даного гена. Точки розриву дістали назву M-*bcr* (**M**ajor *bcr*), m-*bcr* (**m**inor *bcr*) та μ -*bcr* (**m**icro *bcr*) відповідно до частоти цієї події (24).

Ген має довжину 178975 п. н., складається з 23 екзонів та містить 7 консервативних доменів (рис 1.2): 1) RhoGEF, що відповідає амінокислотам 499-689, відомий також як DH домен; 2) RhoGAP_*Bcr*, який відповідає амінокислотам 1008-1208, цей домен характерний для *Bcr*-подібних білків; 3) Домен олігомеризації, який відповідає амінокислотам 2-72 і необхідний для олігомеризації онкопротеїну BCR/ABL (25); 4) RhoGAP, що відповідає амінокислотам 1023-1186; 5) PH_*Bcr*-related, який відповідає амінокислотам 707 – 767; 6) PH-подібний домен, що відповідає амінокислотам 830 – 867; 7) C2 домен, який відповідає амінокислотам 913 – 989 та забезпечує здатність зв'язувати Ca^{2+} . (26).

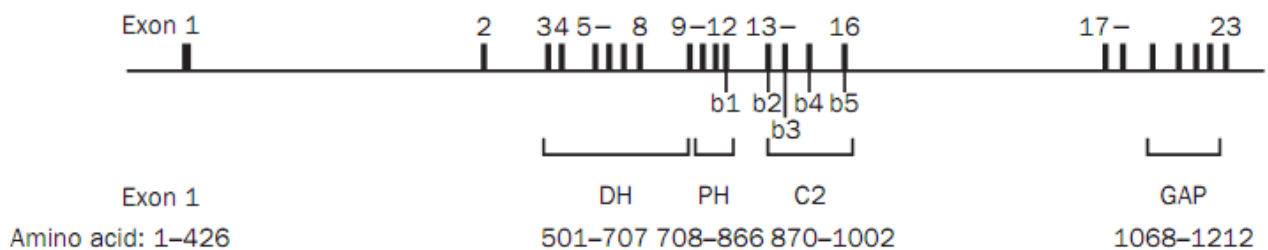


Рис 1.2. Інтронно-екзонна структура гена *bcr*. Адаптовано до (27)

Ген *bcr* вперше було охарактеризовано в контексті дослідження злитого гена *bcr/abl*. У зв'язку з цим виникла необхідність охарактеризувати його функцію в нормі. Було виявлено, що *bcr* здатен транскрибуватися в двох ізоформах з довжиною мРНК 7 та 4,3 кб. При цьому в 4,3 кб міститься вся необхідна інформація для синтезу повноцінного білкового продукту. Білок BCR має молекулярну масу 160 кДа та зазвичай локалізується в цитоплазмі (28). Окрім кровотворних клітин, BCR також може експресуватися в епітеліальних клітинах та клітинах головного мозку (29,30).

BCR здатен фосфорилувати власні залишки за рахунок внутрішньої серин/треонінової кіназної активності (31).

Пост-трансляційні модифікації можуть змінювати активність та здатність білків до міжмолекулярних взаємодій. До них належать: глікозилування, ацетилювання, приєднання та від'єднання нуклеотиду (аденілювання, уридилування, тощо), а також фосфорилування (32). Фосфорилування часто виступає молекулярним перемикачем для зміни активності білка, що бере участь в сигнальних шляхах (33). Зокрема, BCR має внутрішню серин/треонінову кіназну активність, що виявляється у фосфорилуванні залишку серину в 354 положенні (31). Окрім цього функціональна активність BCR змінюється при фосфорилуванні залишків тирозину в 177, 327 та 360 положенні. Таке фосфорилування може здійснюватися в тому числі білком ABL. Фосфорильований тирозин 177 здатен зв'язуватись з SH2 доменом білка Grb2, що здатен формувати комплекс з білком Sos, який є фактором обміну білка Ras (34). Таким чином, фосфорилування тирозину в 177 положенні залучає BCR до Ras-сигналювання. Фосфорилування серину 354 та тирозинів 327 та 360 є антагоністичним по відношенню до серин/треонінової кіназної активності BCR та тирозинової кіназної активності ABL, оскільки фосфорильований серин 354 пригнічує активність ABL через зв'язування з його SH2 доменом, а фосфорильовані тирозини 327 та тирозин 360, в свою чергу, призводять до втрати кіназної активності BCR (рис. 1.3) (28,35).

Наявність RhoGEF та RhoGAP доменів у складі BCR дозволяє припустити, що він відіграє певну роль в процесі регуляції клітинного циклу, оскільки ГТФ-опосередкована передача сигналу є досить поширеною в клітині і виконує різноманітні функції, в тому числі передачу сигналу між ядром та цитоплазмою, регуляцію транскрипції, реплікації, та ін. (36,37). Нещодавно було виявлено регуляторну петлю між цими доменами та Ras ГТФазами. До складу цієї петлі входять власне Ras ГТФази, що здатні знаходитись в ГТФ-зв'язаному активному стані та ГДФ-зв'язаному неактивному стані, RhoGAP та RhoGDI. Дослідження проведені на мутантних мишах з підвищеною експресією *RhoGDI α* показали, що в

присутності білка RhoGDI α BCR не здатен каталізувати від'єднання гуаніну від Ras-ГТФ з подальшим утворенням Ras-ГДФ. Це відбувається через те, що формується

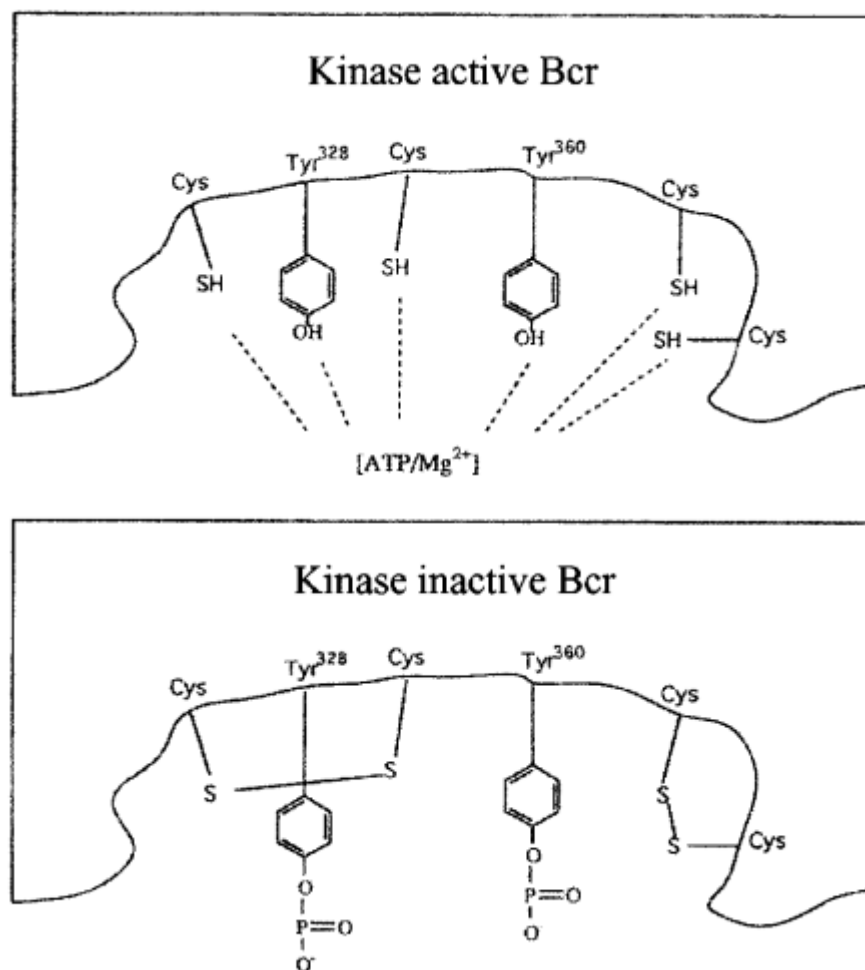


Рис. 1.3. Інактивація кіназної активності BCR у складі BCR/ABL за рахунок фосфорилування тирозину 328 та тирозину 360 з боку ABL. Адаптовано до (31)

білковий комплекс між RhoGAP доменом BCR та RhoGDI α . Цікаво, що активна ГТФ-зв'язана форма Ras послаблює білок-білкові взаємодії між RhoGAP та RhoGDI α , а втрата здатності RhoGAP зв'язуватись з Ras також призводить до неможливості зв'язуватись з RhoGDI α . Це наштовхує на наступні висновки: по-перше, зв'язування Ras-ГТФ або RhoGDI α з RhoGAP доменом BCR взаємовиключне, по-друге, ГТФазна активність RhoGAP домену регулюється співвідношенням субстрату (Ras) та інгібітора (RhoGDI α) (38–40).

Окрім посттрансляційних модифікацій для передачі сигналу також необхідно забезпечити правильну локалізацію білка, що передбачає взаємодію з мембранами та

мембран-асоційованими білками. Цю властивість в складі BCR забезпечують PH та C2 домени (41). Послідовності, які кодують PH-подібні домени дуже розповсюджені в геномі людини і основна їх функція – зв'язування з фосфоліпідами (41–44). C2 домен забезпечує зв'язування з іонами кальцію на мембранах (26). Окрім цього, BCR також містить PDZ-зв'язувальну послідовність на С-кінці, що здатна зв'язуватись в епітеліальних клітинах з AF-6 білком через його PDZ домен. BCR, AF-6 та Ras здатні формувати комплекси в районі щільних контактів між епітеліальними клітинами. Така взаємодія призводить до пригнічення Ras-опосередкованої передачі сигналу та проліферації клітин. Імовірно, що в гемопоетичних клітинах подібна взаємодія має вплив на їх диференціювання (45).

Більшість описаних вище даних було отримано в результаті дослідів *in vitro*. Для з'ясування функції BCR *in vivo* було створено лінію мутантних за цим геном мишей. Було показано, що мутантні миші незначно відрізнялись від мишей дикого типу. Основні відмінності полягали в зниженні здатності нейтрофілів та макрофагів до оксидативного викиду, що зменшувало ефективність протидії патогенним мікроорганізмам. Це відбувається через втрату здатності до ГТФ-опосередкованої регуляції білка Ras, зв'язаного з мембраною та відповідального за регуляцію оксидативного викиду. Окрім цього, у гемопоетичних клітинах мишей з нокаутом за цим геном також було виявлено більшу кількість реактивних форм кисню. Виявлено також вплив на поведінку – самці, мутантні за BCR, були більш агресивні та мали меншу вагу, в їх крові було виявлено більшу кількість глюкокортикоїдів, ніж у самців дикого типу. Це показує роль BCR у неспецифічній адаптації до стресу. Цікаво, що хоча на культурах клітин була показана здатність BCR інгібувати онкогенну активність BCR/ABL, у мишей-мутантів за *bcr* з експресією *bcr/abl* не виявлено достовірних відмінностей в характері розвитку хвороби порівняно з мишами, в яких *bcr* коекспресувався з *bcr/abl* (46).

1.3. Характеристика та функції гену *abl* людини.

Ген *abl* (відомий також як *abl1*) знаходиться на 9 хромосомі в ділянці q34, кодує нерцепторну тирозинову протеїнкіназу та експресується у більшості тканин. Існують дві ізоформи *abl*, (для людини позначаються 1a та 1b, для миші – I та IV) що продукуються за рахунок альтернативного сплайсингу першого екзону (47–49). На N-кінці послідовності містяться SH2 та SH3 домени, а також тирозин-кіназний домен. Ці домени формують структуру, яка діє як інгібіторний замок для тирозин-кіназного домену. Це досягається через взаємодію SH2 та SH3 доменів (35). На C-кінці ABL містяться 4 PXXP SH3-зв'язувальні мотиви (PP), 3 домени ядерної локалізації (NLS), один домен ядерного експорту (NES), ДНК-зв'язувальний домен (DBD), актин-зв'язувальну ділянку (ABD), яка складається з 2 доменів – один зв'язується G-актином, інший – з F-актином (рис. 1.4) (50).

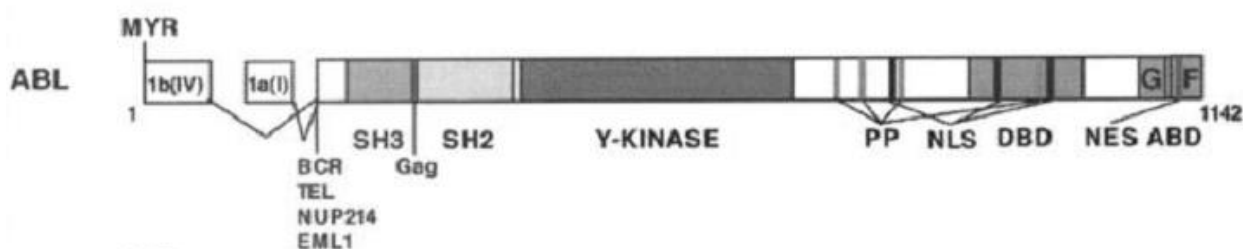


Рис.1.4. Доменна структура послідовності гену *abl*. Адаптовано до (50)

Білок ABL здатен до переходу між ядерною та цитоплазматичною локалізацією. Це відіграє важливу роль у передачі сигналу від поверхні клітини та рецепторів до елементів цитоскелету, що призводить до його реорганізації у відповідь на зовнішньоклітинні стимули (51). Миші, в яких у гені *abl* були делетовані актин-зв'язувальні домени, характеризувались високою внутрішньоутробною смертністю, лімфопенією, остеопорозом та аномальним розвитком голови та очей (50).

Розпад автоінгібуючої структури “SH2-SH3-тирозинкіназний домен” призводить до активації онкогенних властивостей ABL в результаті набуття неконтрольованої протеїнкіназної активності (35). Вперше здатність ABL викликати онкогенну трансформацію була показана на прикладі *v*-ABL, тирозин-кінази вірусу лейкемії мишей Абельсона (52). Пізніше було виявлено, що у людини *abl* зливається з іншими

генами внаслідок хромосомних транслокацій з утворенням химерних продуктів, зокрема BCR-ABL, TEL-ABL, TEL-ARG, NUP214-ABL, EML 1-ABL, що були виявлені у низці онкогематологічних захворювань (50). Це свідчить про те, що неконтрольована експресія *abl* призводить до надмірного фосфорилування білків в клітині внаслідок надмірної тирозин-кіназної активності продукту цього гену. Таким чином, у складі химерних білків ABL може набувати нової функції, відмінної від тієї, що властива нормальному повнорозмірному білку.

1.4. Роль химерних білків BCR/ABL та ABL/BCR в розвитку різних форм лейкемії.

Внаслідок хромосомної транслокації $t(9;22)(q34;q11)$ утворюються різні варіанти злитих генів *bcr/abl* та *abl/bcr*. При цьому, в залежності від місця розриву в гені *bcr*, до *bcr/abl* потрапляють послідовності тих чи інших доменів BCR. З трьох відомих варіантів *bcr/abl* найкоротший, p190, асоційований з гострою лімфобластною лейкемією, в той час як варіант p230 зустрічається при хронічній нейтрофільній лейкемії (24,29). Такі відмінності можуть визначатися впливом певних доменів BCR. Зокрема, у p210 наявні PH та DH домени, а у p230 – кальцій-зв'язувальний та укорочений Rac-GAP домен (50). (рис. 1.5).

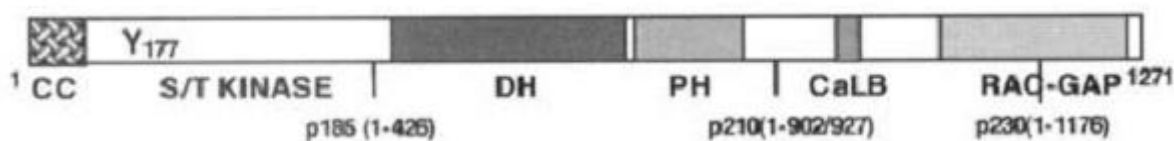


Рис. 1.5. Місця розриву в гені *bcr* при хромосомній транслокації $t(9;22)(q34;q11)$ з зазначенням утворення різних форм химерного гена *bcr/abl* – p190, p210, p230. Адаптовано до (27)

Роль вищеназваних доменів в складі BCR/ABL потребує вивчення, однак відома їх функція в складі повнорозмірного BCR та в складі інших білків. Зокрема, PH та DH домени мають властивість зв'язуватись з певними класами ліпідів, наприклад з фосфатидилінозитолфосфатами. Кальцій-зв'язувальний домен необхідний для

здійснення примембранного кальцій-залежного сигналювання, а Rac-GAP домен – для ГТФ-опосередкованої передачі сигналу, що забезпечується G-білками (6,39,53,54).

Хоча функція окремих доменів BCR/ABL добре вивчена на прикладі інших білків, а його участь в онкогенній трансформації кровотворних клітин була доведена, подібна трансформація не може бути наслідком впливу лише одного чинника або домена, а є збігом обставин в контексті молекулярних сигнальних шляхів клітини, її мікрооточення, та організму в цілому (3,23). Це було доведено дослідями *in vitro* (за здатністю BCR/ABL трансформувати фактор-залежні лінії гемопоетичних клітин, первинні клітини кісткового мозку миші та CD34 клітини людини) (31,55,56) та *in vivo* (ретровірусна експресія *bcr/abl* в клітинах кісткового мозку мишей призводила до розвитку мієлопроліферативного захворювання) (57).

Онкогенність BCR/ABL визначається внутрішньомолекулярними взаємодіями та участю в ключових сигнальних шляхах. Виявлено, що серин/треонінова кіназна активність BCR та тирозинкіназна активність ABL антагонізують одна одну. Це досягається наступним чином: автофосфорилування серину 354 BCR призводить до його зв'язування з SH2 доменом ABL та інактивації його тирозинкіназної активності, в той же час фосфорилування залишків тирозину 328 та тирозину 360 BCR інактивує його серин/треонінову кіназну активність, запобігаючи фосфорилуванню серину в 354 положенні, що позбавляє його здатності зв'язуватись з SH2 доменом (34). В цьому випадку, неконтрольована тирозин-кіназна активність BCR/ABL призводить до розладу ключових сигнальних шляхів в клітині. Зокрема, фосфорилування тирозину 177 BCR забезпечує цитокін-незалежну проліферацію первинних мієлоїдних клітин через взаємодію GRB2/SOS комплексом, що є складовим Ras сигнального шляху (39,40,58). Окрім цього, здатність до активації Ras шляху показана для SH2 домена ABL, що вказує на наявність функціональних доменів ABL та BCR, які можуть бути взаємозамінними у складі BCR/ABL. Конформаційний стан є також важливим для онкогенності BCR/ABL. Це забезпечується доменом олігомеризації, що знаходиться на С-кінці BCR (25,59).

На відміну від BCR/ABL, роль ABL/BCR в патогенезі різних форм лейкемії досліджена мало. При розриві в M-Bcr утворюється *abl/bcr*_{p96}, при m-Bcr – *abl/bcr*_{p40}. Дослідження X. Zheng et al. показали, що у 65% хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію транскрибується *abl/bcr*_{p40}. В свою чергу *abl/bcr*_{p96} був виявлений у всіх досліджуваних хворих на гостру лімфобластну лейкемію (рис 1.6)

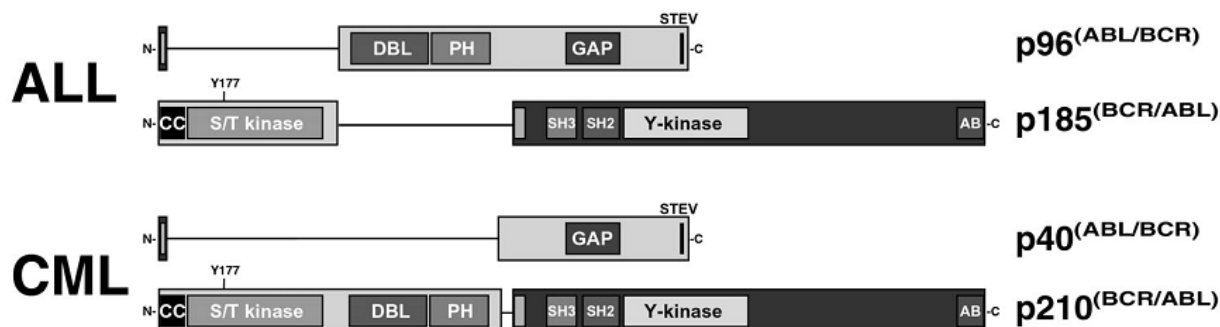


Рис. 1.6. Утворення різних форм химерних генів при хромосомній транслокації $t(9;22)(q34;q11)$ та їх прояв при ХМЛ та ГЛЛ. ALL – форми, характерні для ГЛЛ; CML – форми, характерні для ХМЛ. Адаптовано до (60)

В складі продуктів цих генів відсутні Rho-GEF та Rac-GAP домени BCR. Оскільки вони відіграють важливу роль в організації елементів цитоскелету, то було проаналізовано відмінності у функціях ABL/BCR та дикого типу BCR в трансфікованих клітинних лініях. Автори дійшли висновку, що ABL/BCR втрачає здатність зв'язуватись з Rho-подібними ГТФазами, що знижує рухливість та здатність клітин до адгезії. Оскільки при транслокації утворюються два типи химерних генів, то відсутні в складі ABL/BCR Rho-GEF та Rac-GAP домени містяться в складі BCR/ABL (60). Виходячи з цього, роль ABL/BCR *in vivo* є непідтвердженою і потребує подальшого вивчення, що виходить за межі завдань даної роботи.

Конформаційні зміни важливі для правильного розташування активних центрів, що беруть участь у міжмолекулярних та внутрішньомолекулярних взаємодіях (61). Зважаючи на це, домени BCR та ABL у складі химерного білка можуть набувати нехарактерних функцій, які невластиві цим доменам у складі нормальних білків. Таким чином важливим є порівняння характеристик певних доменів BCR/ABL з їх

гомологами в інших білках та у BCR/ABL. Більше того, слід більш детально розглянути функцію доменів, які присутні у BCR/ABL_{p210}, та відсутні у BCR/ABL_{p190}, оскільки вони можуть бути критичними у визначенні фенотипу захворювання.

1.5 Роль PH домену білка BCR/ABL у молекулярному патогенезі хронічної мієлоїдної лейкемії

Вперше PH домен було виявлено в 1993 році в складі тромбоцитарного білка плекстрину, звідки він отримав свою назву – Pleckstrin Homology (гомологія плекстрину) (62). Даний домен складається з 180-200 амінокислотних залишків і являє собою β -складчасту структуру з 7 β -петлями (63). Найбільш вивчена його функція – зв'язування з фосфатидилінозитолфосфатами (43,44,64). Сиквенс геному людини дозволив ідентифікувати 252 послідовності PH домену (65). Останні дослідження показують, що лише невелика частка з вищеназваної кількості має здатність до міцного зв'язування з фосфатидилінозитолфосфатами. Більш ретельне вивчення дозволило виявити важливу роль PH домену в білок-білкових взаємодіях та заякорюванні білків на мембранах (54,66,67). Зокрема, доведено взаємодію між PH доменом та $G_{\beta\gamma}$ субодиницями гетеротримерних G-білків. Встановлено кристалічну структуру комплексу PH домену рецепторної кінази β ARK з $G_{\beta\gamma}$ субодиницею, з якої видно, що зв'язування білкового ліганда потребує наявності зв'язування з 4-5-фосфатидилінозитолфосфатом (рис. 1.7) (37).

За іншими даними PH домен може зв'язуватись з РКС, фосфоліпазою C- δ_1 , G_{α} -субодиницею G-білка, полімерною формою актину, міозином II типу, транскрипційним фактором II (54,66,67). Названі взаємодії вказують на роль PH домену в рецепторній передачі сигналу, локалізації білків в певному компартменті клітини та регуляції транскрипції.

Оскільки фенотип онкогематологічного захворювання відрізняється в залежності від експресії *bcr/Abl*_{p190} чи *bcr/Abl*_{p210}, то логічним є припущення, що така різниця визначається наявністю чи відсутністю певних функціональних доменів. *Bcr/abl*_{p210} характерний тим, що в його складі містяться PH та DH домени білка BCR, що відсутні

у *bcr/abl_{p190}*. Особливістю DH домену є те, що він є фактором обміну гуанінових нуклеотидів та часто зустрічається в тандемі з PH доменом, тому більш детально розглядається роль саме PH домену в білок-білкових взаємодіях та сигнальних шляхах гемопоетичної клітини (6,53). Miroshnychenko D. *et al.* визначили кандидатів на взаємодію методом мас-спектрометрії коімунопреципітованих з PH доменом білків клітинної лінії K562, трансфікованих плазмідною з PH послідовністю. Аналіз результатів показав, що серед білків, що взаємодіють з доменом PH, найбільш представленими є білки, які беруть участь в ліпідному обміні, внутрішньоклітинному транспорті та міжклітинному сигналюванні (6).

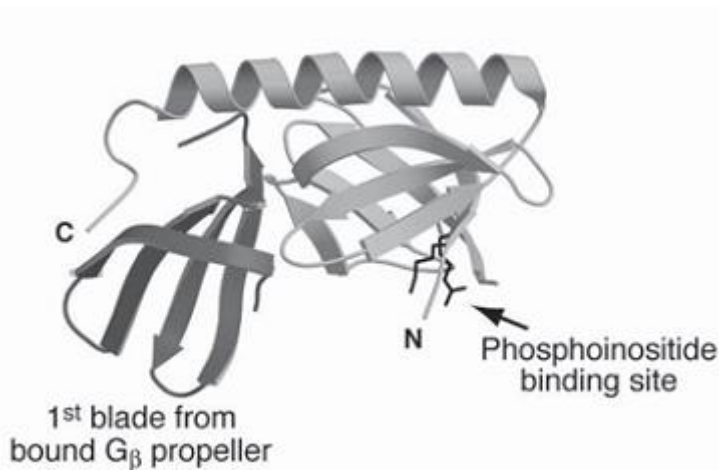


Рис. 1.7. Кристалічна структура комплексу між PH доменом β ARK та $G_{\beta\gamma}$ субодиницею G-білка. Адаптовано до (37)

Таким чином, можна припустити важливу роль PH домену в набутті клітиною підвищеного проліферативного потенціалу та нездатності диференціюватися (23,53). Однак результати мас-спектрометричного аналізу білкових комплексів, виділених з двовимірного електрофорезу, потребують подальшої перевірки взаємодій більш чутливими методами.

1.6. Структура та функції мікротрубочок та різних типів тубуліну.

Мікротрубочки – це поляризовані полімери, зібрані латеральною взаємодією 12-15 протофіламентів. Кожен протофіламент складається з α/β -тубулінових гетеродімерів, які утримуються разом нековалентними зв'язками (68).

Мікротрубочки (МТ) мають унікальну здатність до рецептор-опосередкованої передачі сигналу, оскільки вони розташовані по всій цитоплазмі клітини – від навколоядерної ділянки до цитоплазматичної мембрани.

У більшості клітин, мікротрубочки організовані в єдиний масив, що пов'язаний мінус кінцями з центром організації трубочок (МТОС). Це забезпечує полярність клітини за рахунок структурної полярності, яка властива мікротрубочкам. Як правило, мінус кінці МТ розташовані поблизу ядра в центрі клітини, а їх плюс кінці локалізуються біля периферії клітини поблизу плазматичної мембрани (69).

Молекули кінезину і динеїну використовують цю полярність, шляхом переходу на плюс і мінус кінці МТ, забезпечуючи тим самим систему направленої транспорту. Динамічні перебудови МТ відбуваються в процесі залучення їх до клітинного сигналювання та зв'язування із сигнальними білками. Одним з кращих прикладів МТ-зв'язувального білка, що бере участь в передачі сигналу є Costal 2, який пригнічує сигнальний шлях hedgehog. Costal 2 утворює великий багатовимірний комплекс з іншими компонентами даного шляху, включаючи протеїнкінази і деякі фактори транскрипції. При відсутності протеїнів hedgehog, цей комплекс зв'язується з МТ (70,71). Інший фактор транскрипції, який може регулюватися МТ є NF κ B. ІКВ є негативним регулятором NF κ B, він підтримує NF κ B в неактивному стані в цитоплазмі шляхом утворення комплексу з ним. ІКВ взаємодіє з легким ланцюгом динеїну та з МТ. Ці взаємодії можуть секвеструвати NF κ B або сприяти його транспорту (71).

Динаміка мікротрубочок залежать і від регуляторних білків, таких як асоційовані МТ білки (MAPs) і члени родини кінезину. MAPs, такі як tau і

MAP2, сприяють стабільності МТ за допомогою здатності зв'язувати субодиниці тубуліна в МТ, і можуть сприяти підвищенню упорядкованості масивів мікротрубочок шляхом об'єднання з ними. ХМАР215 і його гомологи є представниками MAPs, вони пов'язують гетеродимери тубуліну і сприяють полімеризації МТ шляхом посилення асоціації тубулінових гетеродимерів з плюс кінцем мікротрубочок. Динамічна нестійкість МТ може бути обумовлена плюс кінцем, який зондує клітинне середовище в пошуках контактів з сайтами-мішенями або органелами, розподіленими по всій клітині. Наприклад, під час мітозу мікротрубочки прикріплені до кінетохорів хромосом, що є важливим для формування мітотичного веретена (68).

Бета-тубулін є не лише цитоплазматичним білком та структурно частиною мікротрубочок, він є важливою мішенню для протипухлинних препаратів. Один із ізотипів тубуліну – тубулін II, на відміну від тубуліну I та IV, наприклад, наявний, в ядрах мезангіальних клітин нирок. Ядерний тубулін зустрічається в різних культурах клітин, як трансформованих, так і нетрансформованих. Трансформовані клітинні лінії раку молочної залози, простати, раку шийки матки, містять тубулін II (72). Отже, бета-тубулін є важливим компонентом мікротрубочок, які забезпечують полярність клітини, беруть участь у мітозі та забезпечують транспорт в клітині. Розуміння механізмів взаємодії та локалізації даного білку з доменом RH білка BCR може бути важливою ланкою в дослідженні розвитку та розробці альтернативних підходів до терапії мієлопроліферативних захворювань

1.7 Характеристика кортактину.

Білок кортактин кодується геном *CTTN*, що знаходиться на довгому плечі 11 хромосоми. Свою назву він отримав через здатність співлокалізуватися з кортикальним актином (**кортикальний актин**) (73). Він забезпечує перебудову актинового цитоскелету у відповідь на зовнішньоклітинні сигнали, які передаються

рецепторними тирозинкіназами (74,75). Кортактин має в своєму складі декілька функціональних доменів: кислий домен, ділянку прямих повторів, домен спіралі, пролін-багату ділянку та SH3 домен (Рис. 1.10) (73).



Рис. 1.8. Доменна структура кортактину. А – кислий домен; Repeat – ділянка прямих повторів; Н – домен спіралі; Р – збагачена проліном ділянка; SH3 – домен гомології SRC. Адаптовано до (73)

Кислий домен довжиною 21-22 амінокислоти зв'язується комплексом Arp2/3 через триптофанвмісний мотив. Така взаємодія необхідна для розгалуження кортикальних актинових філаментів, забезпечуючи структурні зміни елементів мембрани та цитоскелета (76,77). Подібні перетворення відбуваються у відповідь на дію рецепторних тирозинкіназ, що фосфорилують пролін-багату ділянку кортактину (74,78). Фосфорилування цієї ділянки призводить до зміни електрофоретичної рухливості з 80 до 85 кДа за рахунок певних конформаційних перетворень (79). Ці структурні зміни можуть відігравати важливу роль в білок-білкових взаємодіях, полімеризації актину та заякорюванні білків на мембрані (8,77,80,81), однак це потребує подальшого експериментального підтвердження. Низка білків здатна взаємодіяти з SH3 доменом (78) кортактину, серед яких представлені родини факторів обміну гуаніну, ГТФаз, адапторних білків та скафолдних білків (82). Цей факт є додатковим свідченням того, що кортактин бере участь у передачі сигналу від мембранних рецепторів.

Ділянка прямих повторів кортактину складається з 6,5 повторів довжиною по 37 амінокислот. За вторинною структурою вона є типом спіраль-поворот-спіраль. Ділянка прямих повторів аналогічно пролін-багатій ділянці впливає на конформаційний стан кортактину. Окрім цього, третій повтор містить PIP - зв'язувальний домен (83). Оскільки PIP є одним з молекулярних мішеней PH доменів (84–86), то імовірно є участь цієї ділянки у PH-опосередкованих білок-білкових

взаємодіях між BCR/ABL, елементами цитоскелету та мембранними структурами (54).

Протягом довгого часу вважали, що кортактин не синтезується у лімфоцитах. Проте більш пізні дослідження показали, що ген кортактину надмірно експресується у В-лімфоцитах пацієнтів, хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію. В клітинах хворих на лейкемію синтезується дві форми кортактину: 1) дикий тип з молекулярною масою 80/85 кДа, який відсутній у В-лімфоцитів здорових людей; та 2) ізоформа 1 з молекулярною масою 70/75 кДа, яка частково присутня у В-лімфоцитах в нормі. Різниця між цими ізоформами та їхніми властивостями наразі є малодослідженою (87). При нокдауні гену кортактину в лейкемічних В-лімфоцитах знижувався рівень синтезу матриксних металопротеаз 9 та зменшувався потенціал клітин до міграції. При інгібуванні кінази родини Src спостерігався аналогічний ефект. У пацієнтів пригнічення активності тирозинкінази Btk (Bruton tyrosine kinase), яка активується у відповідь на сигналінг за участі рецептору хемокінів CXCR4 (C-X-C motif chemokine receptor type 4) та його ліганду CXCL12 (C-X-C motif chemokine ligand 12), призводило до зниження синтезу кортактину в клітинах (88). Паралельно з цим було досліджено, що рівень представленості рецепторів CXCR4 на поверхні Т-лімфоцитів, уражених гострою лімфобластною лейкемією, залежить від кількості кортактину. Висока експресія гену *CTTN* позитивно корелює із активною міграцією лімфоцитів при лейкемії (89). Зазначені дослідження вказують на важливу роль кортактину в регуляції міграції лімфоцитів при лейкемії (87–90).

1.8. Структурна характеристика білку клатрину та його взаємодія із адапторними протеїнами.

У нативному стані білок клатрин має гексамерну будову. До його складу входять 3 ідентичні важкі ланцюги з молекулярною масою 180 кДа та 3 легкі ланцюги з молекулярною масою 30-40 кДа, що формують трискеліонну структуру (рис. 1.7). Важкі ланцюги містять у своєму складі мотиви розпізнавання для клатринових адапторів (91). Наразі виявлено дві ізоформи важких ланцюгів: СНС17 та СНС22

(Clathrin heavy chain). Структурна подібність між двома ізоформами складає 85%. СНС17 ізоформа наявна у всіх тканинах ссавців, вона залучена до процесів рецептор-опосередкованого ендоцитозу, формування лізосом, ендосомального сортування. СНС22 ізоформа активно синтезується у м'язах, її основна роль полягає у забезпеченні ретроградного транспорту від ендосом до транс-відділу комплексу Гольджі. Легкі ланцюги мають дві ізоформи: CLCa та CLCb (Clathrin light chain) (92,93). Вони регулюють самозбирання клатрину в гексагональну структуру за умов *in vivo* та *in vitro* (91,94).

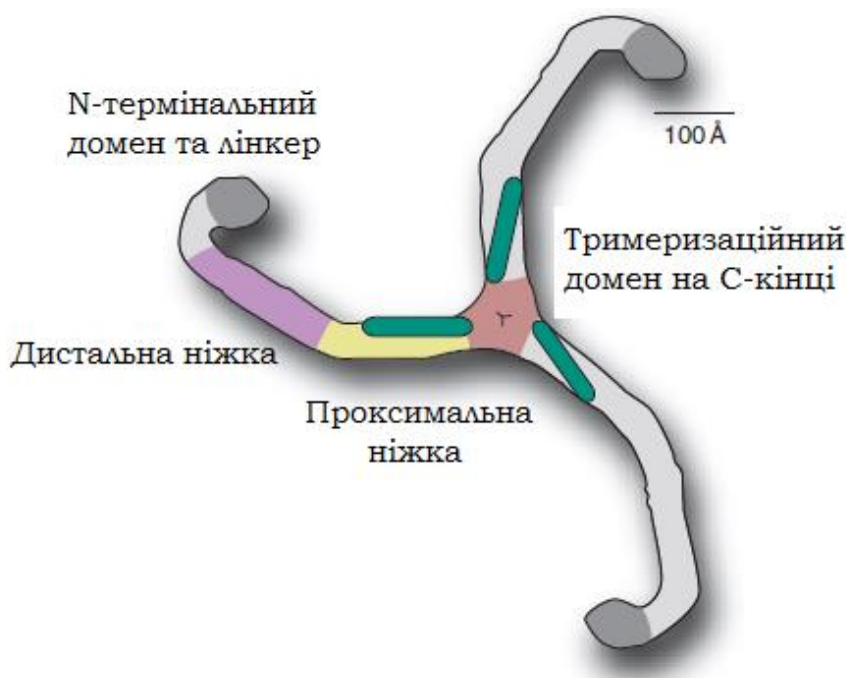


Рис.1.9. Структура нативного клатрину: зеленим кольором позначено легкі ланцюги, сірим кольором – важкі ланцюги. Адаптовано до (94)

Клатрин на пряму не взаємодіє з ліпідами чи трансмембранними рецепторами, тому формування клатринових везикул при ендоцитозі залежить виключно від дії адапторних та допоміжних протеїнів. Розрізняють два основні класи адапторів: класичні та альтернативні, також відомі як CLASPs (Clathrin-associated sorting proteins) (93,94). Класичні адапторні протеїни мають тетрамерну будову та молекулярну масу близько 300 кДа. Одна субодиниця в складі класичного адаптору є варіабельною та відповідає за зв'язування допоміжних білків, наприклад, епсину-1.

Три інші субодиниці є консервативними. Альтернативні адапторні білки мають мономерну, рідше гомодимерну структуру. CLASPs містять домени розпізнавання ліпідів, клатрину, допоміжних протеїнів та сигнальних пептидних залишків молекул, які транспортуються у складі везикул. Добре дослідженим CLASPs білками є GGA (Golgi-associated, γ -ear containing, ADP-ribosylation-factor-binding proteins), котрі одночасно взаємодіють із класичним адаптором AP1 (Adaptor protein 1), AP180, CALM (Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein), епсином та β -арестином для формування ендоцитозних клатринових везикул (91,94,95).

1.9. Методи вивчення білок-білкових взаємодій та внутрішньоклітинної локалізації білків.

Вивчення білок-білкових взаємодій є важливим для розуміння ролі певних білків в утворенні білкових комплексів, сигнальних шляхах, структурній організації клітин, регуляції транскрипції та трансляції, клітинному поділі, міжклітинному сигналюванні, тощо. Серед найпоширеніших методів визначення білок-білкових взаємодій є коімунопреципітація, пул-даун, фаговий дисплей, FRET, PLA тест. Коімунопреципітація працює за рахунок зв'язування іммобілізованого антитіла з білком А, після чого наявність або відсутність взаємодії з білком Б детектується за допомогою вестерн-блотингу з використанням антитіл до білка Б (96). Пул-даун працює за схожим принципом до коімунопреципітації, однак в даному методі використовується афінна хроматографія до специфічного хвоста у досліджуваного білка – полігістидинової послідовності, глутатіон-S-трансферази, мальтозо-зв'язувального білка, тощо (97,98). Після зв'язування на іммобілізованому носії, досліджуваний білок елююється разом із білком партнером та детектується за допомогою вестерн-блотингу. У разі використання фагового дисплею послідовність цільового білка експресується на поверхні білка оболонки фага, після чого зв'язується та детектується за допомогою іммобілізованого антитіла (99). Фестерівський перенос енергії (**F**örster **r**esonance **e**nergy **t**ransfer – FRET) працює за рахунок передачі енергії флуоресценції молекули-донора до молекули-акцептора при дуже близькій відстані

між ними (5-10 нм). При цьому спектр випромінювання акцептора повинен співпадати із спектром збудження донора. При передачі енергії відбувається згасання флуоресценції донора та підвищення флуоресценції акцептора (100). PLA (proximity ligation assay) працює за рахунок кон'югації цільових послідовностей з короткими фрагментами ДНК, які зшиваються в разі взаємодії білків між собою. Потім зшита таким чином ДНК ампліфікується за допомогою кільцевої ампліфікації та детектується за допомогою флуоресцентного барвника, що зв'язується з ДНК (101,102).

Окрім вивчення білок-білкових взаємодій важливим є також локалізація білкових комплексів всередині клітини. Це досягається за рахунок світлової флуоресцентної мікроскопії та електронної мікроскопії. Флуоресцентна мікроскопія дозволяє виявити мічені флуоресцентними мітками білки. Це може бути трансфекція клітин плазмідами, що кодують цільові білки злиті з флуоресцентними білками, які найчастіше за все є модифікаціями зеленого флуоресцентного білка з медузи *Aequorea victoria* (103) або червоного флуоресцентного білка з кнідарій роду *Discosoma* (104). Іншим способом є використання антитіл до ендогенних білків, що кон'юговані з флуоресцентною міткою (105). Також існують підходи з використанням CRISPR/CAS технології редагування геному, яка вставляє в геном клітини цільовий ген, злитий з геном флуоресцентного білка. Таким чином білок в клітині експресується на ендогенному рівні, так як знаходиться під нативним промотором, що вирішує проблему надекспресії, яка може виникнути при трансфекції плазмідами (106). Флуоресцентна мікроскопія має обмеження роздільної здатності та не здатна дискримінувати окремі об'єкти, що знаходяться ближче один до одного ніж половина довжини хвилі, що випромінюється цими об'єктами (ліміт Аббе), що зазвичай становить 250 - 300 нм (107). Електронна мікроскопія має вищу роздільну здатність – до 50 пм (108). Однак електронний мікроскоп хоч і дозволяє вивчити ультраструктури, не дозволяє ідентифікувати окремі білки. Часткове вирішення цієї проблеми досягається за рахунок флуоресцентної мікроскопії надвисокої роздільної здатності. Існує досить багато різновидів флуоресцентної мікроскопії надвисокої роздільної здатності, однак більшість з них можна поділити

на дві категорії – стохастичні та детерміністичні (109). Стохастичні методи використовують математичну реконструкцію необробленого зображення для отримання субдифракційного зображення. Зокрема, це метод мікроскопії стохастичної оптичної реконструкції – STORM (**S**tochastic **o**ptical **r**econstruction **m**icroscopy). Він полягає у використанні ефекту миготіння флуорофорів в результаті зміни їх стану із вимкненого в увімкнений. Ця зміна детектується швидкісною EM-CCD камерою, після чого зображення обробляються, вираховуються центри точок миготіння та виконується реконструкція. При цьому роздільна здатність може досягати 20 нм (110). Детерміністичні методи не використовують реконструкцію, а отримують зображення надвисокої роздільної здатності під час детекції за рахунок фізичних властивостей флуорофора та оптичної конструкції мікроскопа. Прикладом детерміністичного методу є мікроскопія стимульованого виснаження випромінювання – STED (**s**timulated **e**mission **d**epletion). Вона базується на конфокальній мікроскопії, однак окрім лазера, що збуджує флуорофор, використовується також лазер для виснаження випромінювання флуорофору, що має форму бублика. За рахунок такої форми лазера, відбувається гасіння флуоресценції навколо центру випромінювання, залишаючи лише ділянку в центрі. Таким чином відбувається покращення роздільної здатності до 40 нм (111). Виявлення співлокалізації за допомогою мікроскопії надвисокої роздільної здатності означає, що білки знаходяться на відстані один від одного, ближчій ніж 20-40 нм, що є підставою вважати, що вони формують комплекс за рахунок прямої чи непрямой взаємодії. Загалом, використання мікроскопії надвисокої роздільної здатності здатне доповнити та уточнити результати, отримані за допомогою конфокальної мікроскопії.

1.10. Порушення функціонування цитоскелету та везикулярного транспорту при онкогематологічних захворюваннях.

Роль порушень функцій цитоскелету та везикулярного транспорту є добре вивченою для солідних пухлин (16). Підвищений рівень експресії кортактину корелює з підвищеною агресивністю та інвазивністю за рахунок формування

інвадоподій та підвищеної експресії матриксних металопротеаз (12). Деретуляція експресії білків, що беруть участь в ендодитозі, має місце при багатьох онкологічних захворюваннях та регулює здатність пухлин до метастазування (112).

Роль порушень функцій цитоскелета в онкогенній трансформції гемопоетичних клітин досліджена мало. Існують дані, що деретуляція Wnt5 сигнального шляху призводять до порушення полярності локалізації філаментарного актину. Внаслідок цього порушується міграція та адгезія гемопоетичних стовбурових клітин, а також підвищується їх здатність до диференціації, що було також продемонстровано на BCR/ABL_{p190}-позитивних лейкомічних клітинах, які втрачали здатність до ініціювання лейкомії у 42% реципієнтів (113). Мутація у ГТФазному домені гена, що кодує динамін-2 (DNM2^{V265G}), часто зустрічається при Т-клітинній лімфобластній лейкомії. Дана мутація призводила до втрати здатності інтерналізувати рецептор інтерлейкіну-7 за рахунок клатрин-опосередкованого ендодитозу. Внаслідок цього відбувалося накопичення IL-7 рецепторів на поверхні клітини та втрата здатності до диференціації через підсилення IL-7 рецепторного сигналювання (114). Активація нейрон-специфічного динаміну-1 призводить до запуску AKT/GSK3 β сигнального шляху в немілкоклітинній карциномі легень людини (115). Фосфатидилінозитол-зв'язувальний лімфоїдний міелоїдний білок збирання клатрину (**P**hosphatidyl**i**nositol **b**inding **c**lathrin **a**ssembly **l**ymphoid **m**yeloid – PICALM) регулює розміри та форму клатринових пухирців, що від'єднуються від плазматичної мембрани. Дефіцит цього білка у мишей призводив до накопичення незрілих кровотвориних клітин попередників еритроцитів та нездатності клітин поглинати трансферин шляхом клатрин-опосередкованого ендодитозу (116).

Білки родини Rho ГТФази регулюють реорганізацію цитоскелету в гемопоетичних стовбурових клітинах впливаючи на формування сайтів фокальної адгезії, філоподій та ламелоподій. Також Rho ГТФази регулюють полімеризацію мікротрубочок, зокрема фосфорилування онкобілка OP18 білком PAK, що є ефектором Cdc42/Rac ГТФази, забезпечує елонгацію мікротрубочок на + кінці. Порушення реорганізації цитоскелету у кровотвориних клітинах пошкоджує їх міграцію, адгезію до строми кісткового мозку, хемотаксис, та диференціацію (117).

Підвищена експресія кортактину, що регулює розгалуження актинового цитоскелету, була виявлена при хронічній лімфоцитарній лейкемії. Було виявлено, що його експресія корелює з рівнем матриксних металопротеаз та підвищеною рухливістю неопластичних клітин. Нокдаун кортактину та селективне інгібування його активатора – SRC кінази, призводив до зниження міграційної активності лейкемічних клітин та зменшення кількості матриксних металопротеаз (88). Окрім цього підвищена експресія кортактину спостерігалася при В-клітинній гострій лімфобластній лейкемії, яка призводила до більш агресивної інфільтрації лейкемічних клітин у внутрішні органи та витісненню ними нормальних клітин із строми кісткового мозку (118).

Мутації та зміна експресії генів тубуліну призводить до виникнення резистентності до терапевтичних препаратів, мішенню яких є мікротрубочки (119). Окрім цього варто зазначити, що порушення центросоми – центру організації мікротрубочок, спостерігається при мієлопроліферативних захворюваннях (120). На прикладі білка FGFR1 було виявлено, що конститутивна тирозин-кіназна активність білка, що заякорений в центросомі через його злиття внаслідок хромосомної транслокації з іншим білком, може призводити до порушення нормального функціонування центросоми як регулятора клітинного поділу і, як наслідок, уникнення клітиною апоптозу та іморталізації (121).

Таким чином, враховуючи вищевикладені літературні дані, розуміння ролі регуляції везикулярного транспорту та реорганізації цитоскелету із залученням тубуліну, кортактину та клатрину, зможуть допомогти розширити знання про механізми розвитку та патогенезу BCR/ABL_{p210}-позитивної хронічної мієлоїдної лейкемії.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Розчини, використані в роботі.

Рідке поживне середовище LB (Laurea Broth): 1% Vacto Tryptone(Difco, США), 0,5% Екстракт дріжджів (Nofroxx, Німеччина), 1% NaCl; Тверде поживне середовище LB: 2% агар у LB; DMEM (Biowest, Південна Корея); DMEM complete: DMEM + 10% фетальної бичачої сироватки (Biowest, Південна Корея); DMEM без фенолового червоного для мікроскопії живих клітин з додаванням 20 мМ HEPES (Biowest, Південна Корея); Trypsin-EDTA (Biowest, Південна Корея); Тріс-ацетат-ЕДТА (ТАЕ) буфер рН 8,0: 40 мМ Tris основного, 20 мМ оцтової кислоти, 1 мМ EDTA; Ресуспендууючий розчин для лужного лізису: 50 мМ глюкози, 25 мМ Tris-HCl (рН 8,0), 10 мМ EDTA; лізуючий розчин для лужного лізису: 1% SDS, 0,2 М NaOH; нейтралізуючий розчин для лужного лізису: 3М ацетату калію, 14% льодяної оцтової кислоти; розчин для виділення плазмід на основі неіонних детергентів (NID): 5% сахарози, 50 мМ Tris рН 8,0, 30 мМ EDTA, 0,75М NH₄Cl, 0,5% Triton X-100, 100 мкг/мл лізоциму, 25 мкг/мл РНКазы А; 1000-кратний розчин антибіотиків для додавання в середовище для клітин ссавців: 50000 од./мл пеніциліну, 100 мг/мл стрептоміцину; заключне середовище для мікроскопії: 10% Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich, Німеччина), 2,5% DABCO (Sigma-Aldrich, Німеччина), 25% гліцерину, 100 мМ Tris-HCl рН 8,5; PBS (фосфатно-сольовий буфер): 140 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,8 мМ KH₂PO₄; розчин для фіксації клітин: 4% параформальдегід (Sigma-Aldrich, Німеччина) в PBS; розчин для пермеабілізації клітин: 0,3 % Triton X100 в PBS; розчин для селективної преципітації високомолекулярної РНК: 4,2 М CaCl₂; розчин для селективної преципітації низькомолекулярної РНК: 20% PEG 6000 + 0,5 М NaCl; Розчин для адсорбції ДНК на скловолоконних фільтрах: 5М гуанідин тіоціанат (GuSCN), 50 мМ MES рН 5,5, 20 мМ EDTA рН 8,0, 0,5 % Triton X-100, 5мМ крезоловий червоний; розчин для промивки скловолоконних фільтрів: 10 мМ Tris рН

7,5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 50 % етанол; скловолоконні фільтри GF/C (Whatmann, Велика Британія); 10-кратний реакційний буфер для ПЛР; 25 mM розчин MgSO₄; 2 mM розчин dNTP: 2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP; TBST буфер: 140 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 0,1% Triton X-100; блокуючий розчин: 1% бичачого сироваткового альбуміну (BSA) (Sigma-Aldrich, Німеччина) в PBS; реакційний буфер для T4 PNK: 70 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 5 mM DTT, pH 7,6; реакційний буфер для T4 ДНК лігази: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7,5.

2.2. Обладнання, використане в роботі.

Центрифуга з охолодженням Eppendorf Epp 5415R, конфокальний флуоресцентний мікроскоп Carl Zeiss LSM 510 Meta (Німеччина), широкопольний флуоресцентний мікроскоп Leica DM1000 (Німеччина), мікроскоп з надвисокою роздільною здатністю Leica SP8 STED 3D (Німеччина), Трансілюмінатор Vilber Lourmat (США), спектрофотометр Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, камера для горизонтального електрофорезу в агарозному гелі “Helicon” (Росія), джерело живлення для камери електрофорезу “Эльф-4” (“ДНК-технология”, Росія), шафа біологічної безпеки II класу ESCO (Сінгапур), CO₂ інкубатор Binder (Німеччина), ампліфікатор для ПЛР – Eppendorf Mastercycler Personal 5332 (США).

2.3. Ферменти, використані в роботі.

Термостабільна високоточна ДНК полімераза Pfu (Fermentas, Литва), T4 ДНК лігаза (Fermentas, Литва), термолабільна лужна фосфатаза FastAP (Fermentas, Литва), T4 полінуклеотидкіназа (Fermentas, Литва), ендонуклеази рестрикції EcoRV, EcoRI, BamHI, Sall, HindIII, BglIII (Fermentas, Литва).

2.4. Антитіла та барвники, що використовувалися в роботі.

Первинні антитіла. Моноклональні мишачі: анти-BCR (Santa-Cruz Biotechnology, sc-104), анти-кортактин (Santa-Cruz Biotechnology, sc-55579), анти- γ -тубулін (Thermo Fisher Scientific, MA1-19421), анти-Abl (Calbiochem, OP20). Поліклональні кролячі: анти-клатрин-НС (Abclonal, A7886), анти-BCR (Abclonal, AA0068).

Вторинні антитіла. Кон'юговані Alexa-594 антимишачі антитіла (Thermo Scientific, R37121), кон'юговані STAR-RED антикролячі антитіла (Abberior, Німеччина), антимишачі кон'юговані Alexa-555 антитіла (Abclonal, AS057), анти-кролячі вторинні кон'юговані Alexa-647 антитіла (Abclonal, AS060),

Барвники. ATTO647N-фалоїдин (Sigma-Aldrich, 65906), FITC-фалоїдин (Sigma-Aldrich, P5282), DAPI (Sigma -Aldrich, D9542), SiR-актин (Spirochrome, SC001), SiR-тубулін (Spirochrome, SC002).

2.5. Приготування компетентних клітин *E.coli*

Для приготування компетентних клітин відповідного штаму культуру клітин *E. coli* посіяли на LB агар, що містить 50 мкг/мл селективного антибіотика, та інкубували в термостаті протягом 18 год при 37°C. Потім клітини з поодинокі колонії посіяли в стерильну пробірку з 10 мл рідкого LB середовища, що містить 50 мкг/мл селективного антибіотика та інкубовано в термостаті-шейкері при 37°C та постійному перемішуванні доки значення OD₆₀₀ не досягло 0,5. Пробірку з середовищем охолодили на льоду протягом 10 хв, після чого відцентрифугували 10 хв при 4°C на 8000 g. Супернатант було відібрано, а осад обережно ресуспендовано в 5 мл 0,1 М CaCl₂. Розчин витримали на льоду протягом 30 хв, потім відцентрифугували 10 хв при 4°C на 8000 g. Супернатант відібрали, а до осаду додали 1 мл 0,1 М CaCl₂, що містить 15% гліцерину. Компетентні клітини зберігалися в кельвінаторі при -80°C.

2.6. Вектори, клітинні лінії ссавців та штами *E.coli*.

Клітинна лінія HEK293T, походить від ембріональних тканин нирки людини, та містить T антиген SV40, що сприяє експресії послідовностей, які знаходяться під SV40 промотором. Клітинна лінія K562, походить від хворого на ХМЛ на стадії бластного кризу. Має Філадельфійську хромосому, що несе ген Bcr-Abl_{p210}, а також додаткову транслокацію між 15 та 17 хромосомами.

Для напрацювання рекомбінантних плазмід використовували штаму *E.coli* NEB Turbo (C2984I, New England Biolabs, Великобританія) з генотипом *glnV44 thi-1 Δ(lac-proAB) galE15 galK16 R(zgb-210::Tn10)Tet^S endA1 fhuA2 Δ(mcrB-hsdSM)5, (r_K⁻m_K⁻) F'[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]*.

Вектор pET32a-PH було створено Д.Мірошниченко в нашому відділі для попередніх досліджень (6). Вектор pEGFP-Clathrin був люб'язно наданий Т. Грязною (ІМБіГ, Україна). Вектор pmCherry-Clathrin був люб'язно наданий І. Скрипкіною (ІМБіГ, Україна). Вектор ECFP-C1 (Clontech, США), pBluescriptSKII(+) (Stratagene, США), mCitrineC1 та pmTagRFP-N1 були люб'язно надані М. Девідсоном (Каліфорнійський університет, США) (122,123). Вектор pECFP-Bcr був люб'язно наданий John Groffen та Nora Heisterkamp (плазміда Addgene # 36415; <http://n2t.net/addgene:36415>; RRID:Addgene_36415) (124).

2.7. Створення генетичних конструкцій

Для ампліфікації кодуючої послідовності кортактину використовували праймери CTTN-F (5'-tatagaattcAGATGTGGAAAGCTTCAGCAG) та CTTN-R (5'-tataggatccAAAGAAGGCCTGATCTGTAGTG) та плазмиду pOTV7-CTTN в якості матриці для ПЛР. Параметри реакції були наступними: реакційний буфер для ПЛР, 1.25 mM MgSO₄, 2 mM dNTP, 10 pM прямого праймера, 10 pM зворотнього праймера, 5 одиниць Pfu полімерази, 1 нг плазмідної ДНК; початкова денатурація: 3 хви 93°C, денатурація: 15 с 93°C, гібридизація праймерів: 30 с 60°C, елонгація: 90 с 72°C,

кількість циклів – 30. Отриманий фрагмент було лігровано в вектор pBluescriptSKII(+) по сайту ендонуклеази рестрикції EcoRV. Отримана конструкція pBluescriptSKII(+)-CTTN була використана для вирізання кодуєчої послідовності кортактину та лігування його у вектор pECFP-C3 по сайтам ендонуклеаз рестрикції EcoRI-BamHI. В результаті отримана конструкція для еукаріотичної експресії кортактину злитого з білком ECFP на C-кінці.

Для отримання конструкції pmTagRFP-N1-CTTN спочатку була ампліфікована кодуєча послідовність кортактину за допомогою праймерів CTTN(N)-F (5'-ATGTGGAAAGCTTCAGCAGG) та CTTN(N)-R (5'-AGCTCCACATAGTTGGCTGG). Умови ПЛР були такими ж, як і для ампліфікації кортактину за допомогою праймерів CTTN-F та CTTN-R, як описано вище. Отриманий фрагмент було лігровано в вектор pBluescriptSKII(+) по сайту рестрикції EcoRV. З отриманої конструкції pBluescriptSKII(+)-CTTN(N) кодуєча послідовність кортактину була вирізана по сайтам ендонуклеаз рестрикції SallI-BamHI та лігвана в вектор pmTagRFP-N1 по цим же сайтам. В результаті отримана конструкція для еукаріотичної експресії кортактину злитого з білком mTagRFP на N-кінці.

Для створення конструкції pmCitrine-C1-PH фрагмент домену PH білка BCR був вирізаний з вектора pET32a-PH по сайтам ендонуклеаз рестрикції BamHI-HindIII та лігований у вектор pmCitrineC1 по сайтам ендонуклеаз рестрикції BglII-HindIII. В результаті було отримано конструкцію для еукаріотичної експресії домену PH білка BCR злитого з білком mCitrine.

2.8. Виділення плазмід за допомогою лужного лізису.

Культуру клітин E.coli, що досягла лаг фази росту та містить плазмиду інтересу осадили центрифугуванням при 2000 g протягом 20 хв. Відібрали надосад. Повторили процедуру до тих пір, поки вся культура клітин не буде осаджена. До осаду додали ресуспендуєчий розчин для лужного лізису в об'ємі, що становить 1/20 від об'єму рідкого середовища, в якому росли клітини. Ресуспендували клітини та витримали при +4°C на льоду протягом 10 хв. До ресуспендованих клітин додали подвійний

об'єм лізуючого розчину, обережно перемішали вміст перевертанням пробірки та залишили на 5-10 хв при кімнатній температурі. Для нейтралізації лізису додали 0,75 об'єму нейтралізуючого розчину відносно доданого на попередньому етапі лізуючого розчину, обережно перемішали та витримали 10 хв на льоду при +4°C. Нейтралізований розчин профільтрували за допомогою паперової серветки та воронки. До фільтрату додали 0,6 об'єму ізопропанолу, перемішали та відцентрифугували при 2000 g протягом 20 хв. Надосад аспірували та додали 1/10 об'єму етанолу відносно об'єму зразка з ізопропанолом, що був відцентрифугований на попередньому етапі. Відцентрифугували 5 хв при 2000 g. Надосад відібрали, а пробірки з осадом ДНК поставили в термостат на +37°C у відкритому стані до висушування залишків спирту. До висушеного осаду додали необхідну кількість дистильованої води для розчинення ДНК (125).

2.9. Виділення плазмід за допомогою неіонних детергентів.

Для мініпрепаратів плазмід використовували метод виділення за допомогою неіонних детергентів (126). Культуру клітин *E.coli*, що досягла лаг фази росту та містить плазмиду інтересу осадили центрифугуванням при 10000 g протягом 5 хв. Видалили супернатант. Повторили процедуру до тих пір, поки вся культура клітин не буде осаджена. До осаду клітин додали 1/10 об'єму розчину NID відносно об'єму середовища, в якому росли клітини. Ресуспендували клітини до утворення однорідної маси та інкубували на водяній бані при +65°C протягом 10 хв. Відцентрифугували на центрифугузі при 16000 g протягом 40 хв. Осад обережно відібрали за допомогою стерильної зубочистки та видалили. До супернатанту додали 0,6 об'єму ізопропанолу. Відцентрифугували протягом 20 хв при 16000 g. Супернатант аспірували, до осаду додали 1 мл 70% етанолу. Відцентрифугували протягом 5 хв при 16000 g. Супернатант видалили, а пробірки з осадом ДНК поставили в термостат на +37°C у відкритому стані до висушування залишків спирту. До висушеного осаду додали необхідну кількість дистильованої води для розчинення ДНК.

2.10. Розрізання ДНК ендонуклеазами рестрикції

Для реакції брали 1 мкг ДНК та 2 одиниці відповідної ендонуклеази рестрикції. Реакційний буфер підбирали за рекомендаціями виробника. Реакцію проводили протягом 1 год при +37°C. Після завершення реакцію інактивували інкубацією реакційної суміші при +65°C або +80°C в залежності від рекомендацій виробника щодо конкретної ендонуклеази рестрикції. Якщо ендонуклеаза рестрикції термостабільна та не піддається інактивації температурою, то проводилася очистка на колонках зі скловолоконними фільтрами або реакційна суміш одразу наносилася на агарозний гель для проведення електрофорезу.

2.11. Обробка фрагментів ДНК після розрізання ендонуклеазами рестрикції.

Для запобігання самолігування вектора його кінці обробляли 2 одиницями термолабільної лужної фосфатази FastAP при +37°C протягом 1 год. Інактивація реакції проводилася при +65°C протягом 10 хв. Фрагменти ДНК, призначені для лігування у відповідні вектори, фосфорилювали за допомогою T4 PNK. Реакційна суміш складалася з ДНК, реакційного буфера для PNK, 0,5 mM АТФ, 5 одиниць T4 PNK. Реакцію проводили при +37°C протягом 30 хв. Інактивували реакцію нагріванням до +75°C на водяній бані протягом 20 хв.

2.12. Лігування фрагментів ДНК

Лігування вектора та вставки відбувалося за наступних умов: 5 одиниць T4 ДНК лігази, 0,5 mM АТФ, реакційний буфер для T4 ДНК лігази, вектор та вставка в молярному співвідношенні 1:3 та сумарній кількості 200 нг. Лігування проводили за температури +20°C протягом 18 год. Інактивували реакцію нагріванням до +75°C протягом 20 хв. Після інактивації лігазну суміш безпосередньо використовували для трансформації компетентних клітин *E. coli*.

2.13. Трансформація компетентних клітин *E. coli*.

Хімічно компетентні клітини *E.coli* штаму NEB Turbo були розморожені на льоду протягом 10 хв. До клітин було додано розчин плазмідної ДНК або лігазна суміш, об'єм якої не перевищував 10% від об'єму компетентних клітин. Суміш ДНК та компетентних клітин витримали на льоду при +4°C протягом 30 хв. Після інкубації витримали суміш на водяній бані протягом 90 с при +42°C, після чого одразу помістили в лід на 1 хв. До суміші додали подвійний об'єм стерильного поживного середовища LB та інкубували протягом 1 год при +37°C при постійному перемішуванні. Після інкубації клітини осадили центрифугуванням протягом 5 хв при 5000 g. Осад ресуспендували в 100 мкл рідкого поживного середовища LB та висіяли на чашки Петрі з твердим середовищем LB та селективним антибіотиком за допомогою скляної петлі в стерильних умовах. Інкубували чашки догори дном протягом 14 год при +37°C в термостаті. Через 14 год колонії, що виростили на чашках, використовували для посіву в рідке поживне середовище LB з селективним антибіотиком для нарощування протягом 14 год при +37°C при постійному перемішуванні. З нарощеної біомаси клітин в подальшому виділяли плазмідні.

2.14. Очищення плазмідної ДНК.

Для очищення від РНК та отримання плазмідної ДНК достатньої чистоти для трансфекції та обробки ферментами ми використовували метод очистки за допомогою CaCl_2 та PEG6000/NaCl (127). До препарату плазмідної ДНК додали 0,5 об'єму розчину 4.2 М CaCl_2 , перемішали до утворення осаду, осадили центрифугуванням при кімнатній температурі протягом 10 хв при 10000 g. Надосад відібрали в нові пробірки, а осад видалили. До надосаду додали 0.6 об'єму ізопропанолу, осадили центрифугуванням протягом 20 хв при 16000 g. Відібрали надосад, до осаду додали 1 мл 70% етанолу. Відцентрифугували протягом 5 хв при 16000 g, видалили надосад. Осад ДНК висушили при +37°C та розчинили в дистильованій воді. До розчиненої ДНК додали 1:1 об'єм розчину для осадження

низькомолекулярної ДНК (20% PEG6000 та 500 мМ NaCl), перемішали та осадили центрифугуванням протягом 20 хв при 16000 g. Відібрали надосад, до осаду додали 1 мл 70% етанолу. Відцентрифугували протягом 5 хв при 16000 g, видалили надосад. Осад ДНК висушили при +37°C та розчинили в дистильованій воді. Оцінили чистоту та кількість плазмідної ДНК за допомогою спектрофотометра та електрофорезу в агарозному гелі.

2.15. Очищення ДНК на колонках з фільтрами із скловолокна

Очищення ДНК за допомогою хаотропної солі на колонках із фільтрами зі скловолокна може бути застосоване як до реакційної суміші, так і до вирізаного з агарозного геля фрагменту ДНК. До реакційної суміші, або до зваженого фрагмента агарозного геля, що містить ДНК фрагмент інтересу, додали потрібний об'єм адсорбційного буфера. Інкубували на водяній бані при +50°C протягом 10 хв, або до повного розчинення геля в буфері. Нанесли 350 мкл суміші на колонку, що містить 6-8 шарів скловолоконного фільтра GF/C (Whatmann), вставили колонку в прийомну пробірку та відцентрифугували протягом 5 хв при 1000 g. Розчин, що пройшов через фільтр та опинився в прийомній пробірці, видалили. Повторили процедуру, доки весь розчин не пройде через фільтр. Нанесли 350 мкл розчину для промивки колонки на фільтр. вставили колонку в прийомну пробірку та відцентрифугували протягом 5 хв при 1000 g. Повторили двічі. Порожню колонку відцентрифугували при 8000 g протягом 5 хв для позбавлення від буфера для промивання. Вставили колонку в 1.5 мл пробірку, нанесли на фільтр 20-50 мкл дистильованої води, інкубували протягом 1 хв при кімнатній температурі, потім відцентрифугували протягом 2 хв при 2000 g. Концентрацію елюйованої ДНК аналізували за допомогою спектрофотометра Nanodrop 2000.

2.16. Електрофорез ДНК в агарозному гелі.

Розділення нуклеїнових кислот проводили в 1 % агарозному гелі в TAE буфері за напруги 10 В/См. Агарозний гель фарбували в розчині бромистого етидію концентрацією 10 мкг/мл протягом 10 хв. Візуалізацію проводили за допомогою транслюмінатора довжиною хвилі 312 нм. Розмір лінійних фрагментів ДНК порівнювали з маркером молекулярної маси O'GeneRuler 1 kb Plus (Fermentas, Литва).

2.17. Культивування клітин ссавців

Клітини HEK293T культивували в поживному середовищі DMEM complete в CO₂ інкубаторі при +37°C, 5% CO₂ та 95% відносною вологості. При досягненні рівня конфлюентності 70-90% клітини пересівали в нові культуральні чашки Петрі. Поживне середовище забирали за допомогою вакуумного насоса, від залишків середовища промивали стерильним PBS, потім додавали розчин Trypsin-EDTA, інкубували протягом 1 хв при +37°C до від'єднання клітин від поверхні чашки. Ресуспендували клітини в середовищі DMEM complete та переносили в нову чашку Петрі у розведенні 1:10.

Клітини K562 культивували в поживному середовищі RPMI 1640 з додаванням 10 % фетальної бичачої сироватки при +37°C, 5% CO₂ та 95% відносною вологості в стерильних пластикових культуральних матрасах. При досягненні кількості клітин 10⁷ клітини пересівалися в новий матрас в розведенні 1:10.

2.18. Транз'єтна трансфекція клітин ссавців

Трансфекція клітинної лінії HEK293T проводилася за допомогою поліетиленіміну. Клітини пересівалися в 6-луночні плашки зі стерильними покривними скельцями за 24 год до трансфекції, щоб на момент трансфекції конфлюентність клітин становила 50-70%. 1 мкг плазмідної ДНК розчиняли в 100 мкл середовища DMEM, 3 мкл PEI розвели в 100 мкл середовища DMEM в іншій пробірці. Вміст обох пробірок об'єднали та залишили при кімнатній температурі на 20 хв. Після завершення інкубації об'єднаний вміст пробірок, що містить комплекси PEI/ДНК

наносили по краплі в лунку з клітинами HEK293T. Аналізували експресію через 24-48 год.

Трансфекція клітинної лінії K562 проводилася за допомогою трансфекційного агента Turbofect (Fermentas, Литва). Для трансфекції використовували клітини K562 в активній фазі росту в кількості близько $3-5 \cdot 10^6$ в 10 мл поживного середовища. Приблизно 5 мкг плазмідної ДНК розчиняли в 250 мкл ростового середовища RPMI 1640 без сироватки, в іншій пробірці розводили 15 мкл Turbofect в 250 мкл ростового середовища RPMI 1640 без сироватки. Вміст обох пробірок об'єднували та інкубували 20 хв при кімнатній температурі. По завершенні інкубації додали суміш ДНК/Turbofect до культури клітин K562. Аналізували експресію через 24-48 год після трансфекції.

2.19. Фіксація клітин ссавців для флуоресцентної мікроскопії

Фіксація адгезивних клітин HEK293T. Клітини вирощували на стерильних покривних скельцях в чашках Петрі. Відбирали поживне середовище з клітин за допомогою вакуумного насоса. Додали 2 мл фіксуючого розчину, інкубували 20 хв при кімнатній температурі. Відібрали фіксуючий розчин за допомогою вакуумного насоса. В разі якщо клітини будуть використані для імуофлуоресценції, додали 2мл пермеабілізуючого розчину та інкубували 10 хв при кімнатній температурі, після чого відібрали його за допомогою вакуумного насоса. Тричі промили клітини PBS, наносячи 2 мл на поверхню культури клітин та відбираючи супернатант вакуумним насосом.

Фіксація суспензійних клітин K562. Культуру клітин K562 перенесли в 15 мл стерильну пробірку та відцентрифугували на швидкості 500 g протягом 2 хв. Прибрали надосад за допомогою вакуумного насоса. До осаду клітин додали 1 мл PBS, ресуспендували та перенесли в 1.5 мл пробірки. Осадили клітини центрифугуванням протягом 3 хв при 1000 g. Видалили надосад та додали до осаду клітин 200 мкл фіксуючого розчину. Інкубували 20 хв при кімнатній температурі. Відцентрифугували клітини при 1000 g протягом 3 хв. Видалили надосад. До осаду

додали 100 мкл пермеабілізуючого розчину та інкубували протягом 10 хв при кімнатній температурі. Відцентрифугували клітини при 1000 g протягом 3 хв та видалили надосад. Додали 100 мкл PBS, відцентрифугували клітини при 1000 g протягом 3 хв та видалили надосад. Повторили промивку ще два рази.

2.20. Обробка клітин ссавців антитілами та барвниками для використання у флуоресцентній мікроскопії.

Обробка адгезивних клітин HEK293T. Обережно пінцетом вийняли покривне скельце, на якому росли клітини, після пермеабілізації та фіксації. Нанесли 50 мкл блокуючого розчину на шматок парафільму, поклали на нього покривне скло клітинами вниз. Інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі у вологій камері. Тричі промили скельце в PBS. Нанесли 20 мкл первинних антитіл, розведених в PBS, на шматок парафільму, поклали згори покривне скло клітинами вниз та інкубували у вологій камері протягом 18 год при +4°C. Тричі промили скельце в PBS. Нанесли 20 мкл вторинних антитіл з фалоїдином, кон'югованим з FITC або ATTO647N, розведених в PBS, на шматок парафільму, поклали згори покривне скло клітинами вниз та інкубували у вологій камері в темряві протягом 1 год при кімнатній температурі. Тричі промили скельце в PBS. Нанесли 20 мкл розчину DAPI, розведеного в PBS, концентрацією 1 мкг/мл, на шматок парафільму, поклали згори покривне скло клітинами вниз та інкубували у вологій камері протягом 10 хв при кімнатній температурі. Нанесли на предметне скло 20 мкл середовища для заключення, поклали згори предметне скельце клітинами вниз та обережно натиснули серветкою, щоб прибрати зайве заключне середовище. Помістили мікропрепарат в сухе та захищене від світла місце. Через 24 год заключне середовище остаточно заполімеризується і препарати будуть готові до флуоресцентної мікроскопії.

Обробка суспензійних клітин K562. До пермеабілізованих клітин K562 в 1.5 мл пробірці додали 50 мкл блокуючого розчину, ресуспендували та інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі. Осадили клітини центрифугуванням протягом 3 хв при 1000 g. Відібрали супернатант та додали первинні антитіла, розведені в PBS.

Інкубували протягом 18 год при +4°C. Додали 50 мкл PBS, відцентрифугували клітини при 1000 g протягом 3 хв та видалили надосад. Повторили промивку ще два рази. Додали 20 мкл вторинних антитіл з FITC- або ATTO647N-фалоїдином, розведені в PBS. Інкубували у вологій камері в темряві протягом 1 год при кімнатній температурі. Осадили клітини центрифугуванням протягом 3 хв при 1000 g та аспірували супернатант. Додали 50 мкл PBS, відцентрифугували клітини при 1000 g протягом 3 хв та видалили надосад. Повторили промивку ще два рази. Додали 50 мкл 1мкг/мл розчину DAPI в PBS. Ресуспендували та інкубували протягом 10 хв в темряві при кімнатній температурі. Відцентрифугували протягом 3 хв при 1000 g. Видалили супернатант та додали 30 мкл середовища для заключення. Ресуспендували клітини та нанесли на предметне скло. Зверху на краплю середовища з клітинами поклали покривне скло, обережно натиснули серветкою, щоб видалити зайве середовище. Помістили мікропрепарат в сухе та захищене від світла місце. Через 24 год заключне середовище остаточно заполімеризується і препарати будуть готові до флуоресцентної мікроскопії.

Ми використовували наступні розведення антитіл та барвників: анти-BCR – 1:20, анти-CTTN – 1:50, анти-CHC – 1:50, анти-Abl – 1:50, ATTO647N-фалоїдин – 1:50, FITC-фалоїдин – 1:50, Alexa 555 анти-мишачі – 1:50, Alexa 647 анти-кролячі – 1:50, Alexa 594 анти-мишачі – 1:20, Abberior Star RED анти-кролячі – 1:20.

2.21. Флуоресцентна мікроскопія

Для визначення співлокалізації між кортактином та доменом PH BCR, що експресуються з конструкцій pEGFP-C3-CTTN та pmCitrine-C1-PH ми використали інвертований епіфлуоресцентний мікроскоп Leica DM1000.

Для отримання зображень внутрішньоклітинної локалізації білків, експресованих з генетичних конструкцій pEGFP-PH, pmTagRFP-N1-CTTN, pEGFP-BCR, pmCherry-clathrin, pEGFF-clathrin, а також зображень імунозбарвлених клітин, використовували конфокальний флуоресцентний мікроскоп Carl Zeiss LSM 510 Meta зі 100-кратним масляним об'єктивом та 1,4 числовою апертурою. Для збудження

EGFP ми використовували лазерну лінію 405 нм, для збудження EGFP використовували лазерну лінію 488 нм, для збудження mCherry/Alexa555 та SiR-актину/SiR-тубуліну/Alexa647 – лазерні лінії 532 нм та 633 нм відповідно. Послідовний режим лінія за лінією використовувався для живих зображень. Інтенсивність лазера та канали детектування регулювали, щоб уникнути перехресного збудження та спектрального протікання. Ефективний розмір пікселів та вокселів розраховували за критеріями Найквіста.

Для отримання зображень надвисокої роздільної здатності використовували конфокальний флуоресцентний мікроскоп Leica SP8 STED 3D зі 100-кратним масляним об'єктивом та 1,4 числовою апертурою. Для збудження EGFP використовували лазерну лінію 488 нм, для Alexa594 та STAR-RED - 564 нм та 633 нм лазерні лінії. Для виснаження EGFP використовували лазер 594 нм STED. Для одночасного виснаження Alexa594 та STAR-RED використовували лазер 775 нм STED. Для потрібного STED-зображення EGFP-клатрину, Alexa 594 та STAR-RED ми використовували послідовний режим сканування лінія за лінією для 5 каналів: EGFP-конфокальний, Alexa594-конфокальний, STAR-RED-конфокальний, Alexa594-STED, STAR-RED-STED. Після отримання зображень з цих 5 каналів та виснаження Alexa-594 та STAR-RED, ми провели додаткове сканування каналів EGFP-клатрин-конфокальний та EGFP-клатрин-STED, щоб не зруйнувати Alexa594 та STAR-RED лазером виснаження 594 на початковій стадії. Потужність лазера регулювалася індивідуально, щоб отримати оптимальне відношення сигнал / шум та ефективність STED.

2.22. Кількісний аналіз та обробка зображень.

Аналіз та обробка зображень здійснювались за допомогою програмного забезпечення Fiji (128). Аналіз співлокалізації проводився в плагіні JaCOP (129) з використанням коефіцієнтів Мандерса (130). Коефіцієнти Мандерса M1 та M2 представлені у вигляді відсотків співлокалізації білка 1 з білком 2 (M1) та білка 2 з

білком 1 (M2), де значення коефіцієнту Мандерса 1, що означає абсолютну співлокалізацію, в перерахунку на відсотки становило 100%, а повна відсутність співлокалізації, відповідно – 0%. Перед аналізом до зображення було застосовано Гауссівський фільтр розмиття радіусом 1 піксель. Фоновий сигнал вимірювали за допомогою лінійного профайлера і за необхідності віднімали від зображень. Потім зображення деконволюціонували за допомогою плагіна Deconvolution Lab 2 (131) за допомогою алгоритму сумарної варіації Річардсон-Люсі (**R**ichardson-**L**ucy **t**otal **v**ariation – **RLTV**) (132) з теоретичною функцією розсіювання точки (**P**oint **s**pread **f**unction - **PSF**), згенерованої плагіном PSF Generator (133) за допомогою методу **Vorn and Wolf** (134). Кількість ітерацій для деконволюції становила від 5 до 20 і були обрані емпірично для найкращого збереження структури та відсутності артефактів. Генерація остаточного монтажу наборів зображень була здійснена за допомогою плагіна Fiji EzFig (135).

2.23. Дизайн алюмінієвої камери для мікроскопії живих клітин.

Для мікроскопії живих клітин було спроектовано алюмінієві предметні слайди, фрезеровані за допомогою станка з ЧПК. Слайди містять заглиблення, призначені для покривних скелець розміром 18 * 18 мм. Розміри слайдів співпадають з розмірами скляних предметних скелець та містять наскрізний прямокутний отвір з заглибленнями. Покривні скельця поміщаються з обох боків у заглиблення, а ростове середовище розміщено між ними. Герметизація покривних скелець відбувається за рахунок харчової силіконової змазки. Анодування слайдів проводили в 10% H_2SO_4 в алюмінієвій ємкості на льоду при постійному струмі та напрузі 18 В протягом 1 год. Анодування забезпечує хімічну інертність алюмінію та покращує адгезію силіконової змазки. Перевагою даного дизайну слайдів є те, що для них не потрібно підтримувати постійний рівень вологості та CO_2 в інкубаторі на конфокальному мікроскопі, оскільки завдяки герметизації алюмінієвих слайдів силіконовою змазкою не відбувається випаровування середовища.

2.24. Біоінформатичний аналіз сайтів фосфорилування кортактину.

Біоінформатичне передбачення сайтів фосфорилування кортактину тирозинкіназою ABL проводився в програмі GPS 2.1. Поріг чутливості було виставлено в режим максимальної достовірності. Передбачені сайти фосфорилування тирозинкіназою ABL були порівняні з сайтами фосфорилування SRC кінази.

2.25. Статистичний аналіз

Статистичну обробку даних співлокалізації проводили за допомогою мови програмування R в інтегрованому середовищі розробки R Studio з використанням t-критерію Стьюдента (136). Результати експериментів представлені у вигляді середнього арифметичного значення із зображенням стандартного квадратичного відхилення ($\pm SE$). За критичний рівень достовірності при перевірці нульових гіпотез приймали $*p \leq 0,05$. Кожен експеримент проводили не менше, ніж три рази.

РОЗДІЛ 3.

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Створення генетичних конструкцій для визначення внутрішньоклітинної локалізації домену PH білка BCR та кортактину за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

В попередніх дослідженнях було виявлено, що домен PH може потенційно взаємодіяти з кортактином, однак, оскільки ці дані були отримані в результаті мас-спектрометричного аналізу, то виникла необхідність встановити локалізацію такої взаємодії в клітинах. Для визначення внутрішньоклітинної локалізації кортактину та домену PH нами було створено генетичні конструкції (рис. 3.1) для еукаріотичної

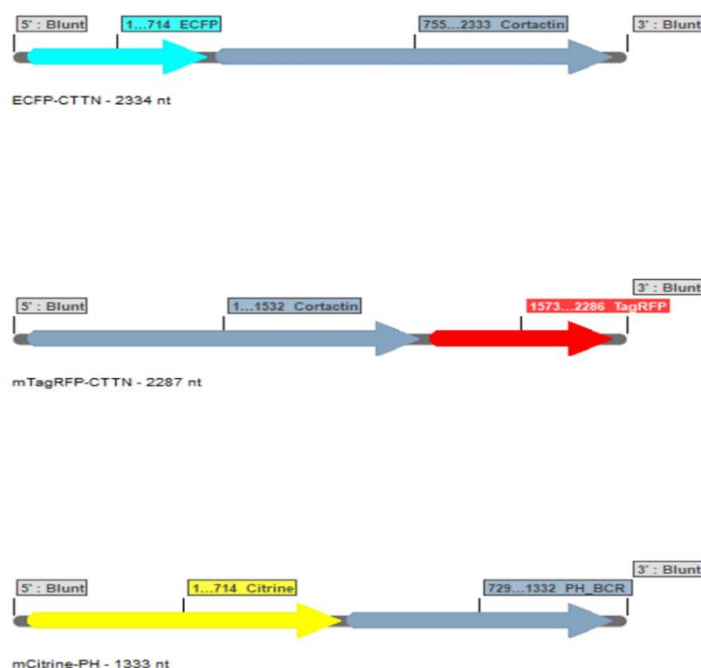


Рис. 3.1. Схематичне зображення нуклеотидних послідовностей кортактину та домену PH білка BCR, злитих з послідовностями флуоресцентних білків ECFP, mCitrine та mTagRFP у складі створених генетичних конструкцій pECFP-C3-CTTN, pmTagRFP-N1-CTTN, pmCitrine-C1-PH. Схематичне зображення згенероване у програмі Serial Cloner

експресії pECFP-C3-CTTN, pmTagRFP-N1-CTTN, pmCitrine-C1-PH. Моделювання конструкцій та побудову графічних карт було зроблено в програмі SerialCloner 3.6.1. В результаті було отримано конструкцію для експресії повнорозмірного кортактину злитого з білком ECFP (**e**nchanced **c**yan **f**luorescent **p**rotein) на його С-кінці, конструкцію для експресії кортактину злитого з білком mTagRFP (**m**onomeric **r**ed **f**luorescent **p**rotein) на його N-кінці, а також для експресії домену PH білка BCR злитого з білком mCitrine (модифікація білка EYFP – **e**nchanced **y**ellow **f**luorescent **p**rotein, що характеризується підвищеною яскравістю флуоресценції) на його С-кінці. Отримані конструкції були перевірені за допомогою рестрикційного аналізу та секвенування методом Сенгера.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковані у наступних роботах:

1. **Gurianov D**, Antonenko S, Telegeev G Colocalization of cortactin and PH domain of BCR in HEK293T cells and its potential role in cell signaling *Biopolymers and cell.* – 2016; 32(1): 26-33.

2. **Гур'янов Д**, Лисецька Т, Кравчук І, Антоненко С, Телегеев Г.Д. Роль домену PH білка BCR у клітинних процесах, що визначають фенотип Ph'-позитивних мієлопроліферативних захворювань. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2014; 15: 44-48.

3. Лисецька Т.Ю., Кравчук І.В., **Гур'янов Д.С.**, Телегеев Г.Д., Дибков М.В. Білки, що взаємодіють з PH доменом BCR-ABL, та їхня роль у формуванні пухлинного фенотипу при розвитку мієлопроліферативних захворювань. Досягнення і проблеми генетики, селекції і біотехнології, ЛОГОС, 2012; 3: 390-394.

4. Тютюнникова А.П., Лисецька Т.Ю., **Гур'янов Д.С.**, Кравчук І.В., Телегеев Г.Д. Структурно-функціональні особливості химерних білків BCR/ABL і їх роль в патогенезі PH-позитивних лейкемій Актуальні питання гематології та трансфузіології, АТІКА, 2011; 143-144.

3.2. Біоінформатичний аналіз сайтів фосфорилювання кіназою ABL тирозинових залишків в складі кортактину.

З літературних даних відомо, що активація кортактину здійснюється за рахунок фосфорилювання його пролін-збагаченої ділянки тирозин-кіназою SRC. За рахунок такої активації відбувається взаємодія кортактину з Arp2/3 комплексом та розгалуження актину. Для того, щоб визначити, чи може тирозин-кіназа ABL впливати на кортактин подібним чином, ми провели передбачення сайтів фосфорилювання тирозинових залишків кортактину кіназами ABL та SRC за допомогою програми GPS 2.1. За допомогою програми було передбачено, що ABL може фосфорилювати залишки Y384, Y396, Y409, Y416, Y427, Y433 та Y449 (рис. 3.2, а), а SRC кіназа – Y297, Y384, Y396, Y409, Y416, Y427, Y433, Y449, Y464 (рис.

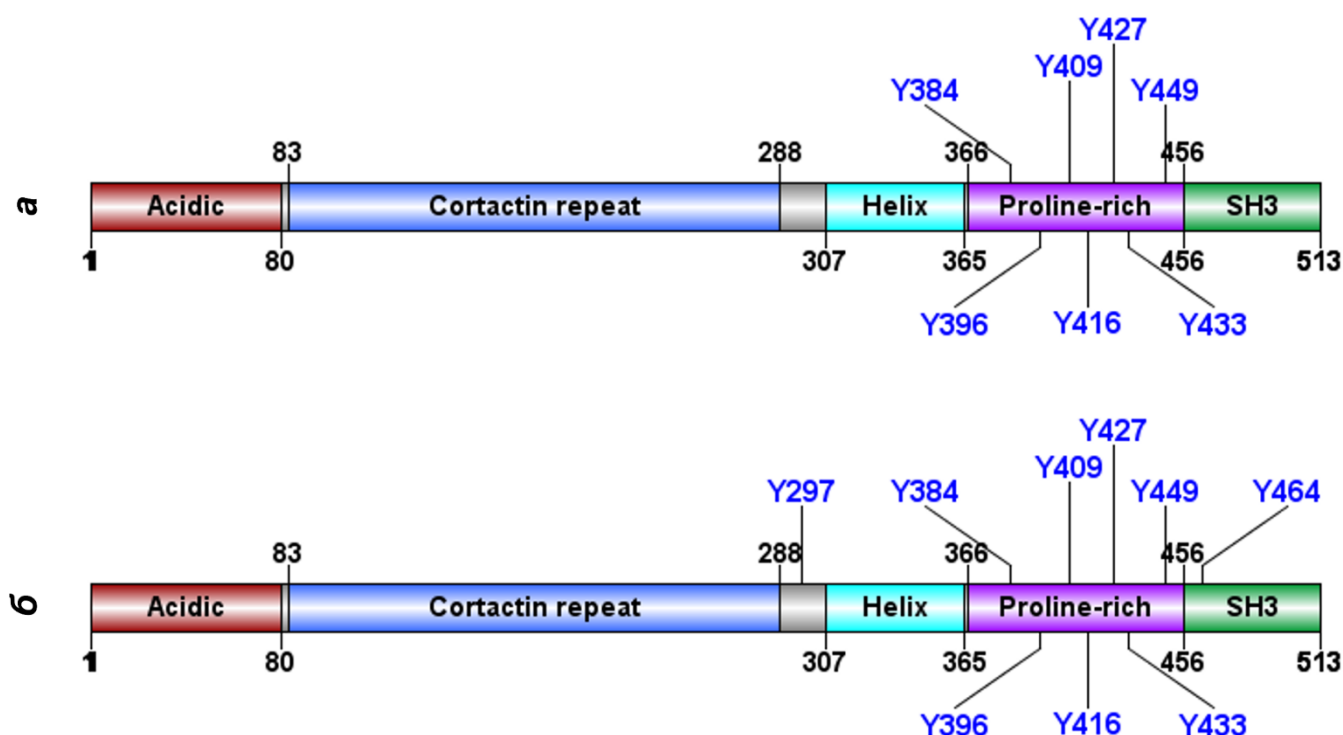


Рис. 3.2. Біоінформатичний аналіз потенційних сайтів фосфорилювання кортактину протеїн-кіназами ABL та SRC. *а* – передбачення для ABL; *б* – передбачення для SRC. На рисунку зображена доменна структура кортактину: acidic – кислий домен, cortactin repeat – ділянка прямих повторів, helix – ділянка спіралі, proline-rich – збагачена проліном ділянка, SH3 – домен гомології SRC

3.2 б). Виявлено, що 7 сайтів ідентичні як для кінази ABL, так і для SRC, і всі вони знаходяться в межах пролін-збагаченої ділянки. Цікаво, що з літературних даних експериментально продемонстровано, що тирозиновий залишок Y384 бере участь у активації кортактину (137).

Результати, викладені у підрозділі, опубліковані у наступних роботах:

1. **Gurianov D**, Antonenko S, Telegeev G Colocalization of cortactin and PH domain of BCR in HEK293T cells and its potential role in cell signaling *Biopolymers and cell.* – 2016; 32(1): 26-33.

2. **Gurianov D.S.**, Kravchuk I.V., Maliuta O.V., Dybkov M.V., Telegeev G.D. Role of PH domain of BCR/ABL fusion protein in cytoskeleton remodeling *Biopolymers and Cell*, 2013; 29 Special Issue: 6

3.3. Розробка мікрослайдів для мікроскопії живих клітин.

Флуоресцентна конфокальна мікроскопія живих клітин має певні особливості, які вимагають уваги. Клітини повинні знаходитися в максимально сприятливих умовах для підтримання нормальної життєдіяльності. В той же час сигнал від флуорофорів, що застосовуються для їх забарвлення повинен бути чітким, контрастним, та позбавленим від шумів. Окрім цього, кількість енергії, що отримують клітини від опромінення лазером повинна зводитись до мінімуму, щоб не порушувати фізіологічні умови, але при цьому отримувати достатньої сили флуоресценцію барвників та флуоресцентних білків. Також необхідно використовувати поживне середовище без фенолового червоного, який може давати автофлуоресценцію. Мікроскоп, на якому отримують зображення повинен бути оснащений інкубатором – це камера з прозорого акрилу, що закриває оптичну частину мікроскопа та предметний столик. В цій камері підтримується температура на рівні 37°C та концентрація CO₂ на рівні 5%. Також значну увагу приділяють ємностям, в яких знаходяться клітини під час отримання зображення на мікроскопі. Пластиковий посуд, що використовується для культивування клітин не підходить для використання з масляними об'єктивами з високою числовою апертурою, адже стінки пластика занадто товсті та перевищують рекомендації щодо товщини покривного скла у межах 0.14-0.18 мм. Окрім цього для пластику характерне розсіювання лазерних променів, що створює артефакти при отриманні зображення. Одним з підходів є створення отвору в дні культурального планшету або чашки Петрі, на який потім приклеюють покривне скло. Клітини висівають на покривне скло, до якого вони прикріплюються. Недоліком цього методу є те, що такий посуд є одноразовим. Окрім цього існує проблема випаровування середовища під час отримання зображення. Випаровування середовища призводить до збільшення концентрації солей в ньому, що може призводити до руйнування клітин внаслідок осмотичного тиску. Для того, щоб обійти цю проблему, у інкубаторі, встановленому на мікроскоп, підтримується достатній рівень вологості, щоб середовище не випаровувалось з культурального посуду. Однак надмірна вологість може бути шкідливою для електроніки, що керує

конфокальним мікроскопом, тому такий підхід має додаткові складнощі. Також існують ємності з нержавіючої сталі, які складаються з двох частин між якими затискається кругле покривне скло за допомогою силіконової прокладки. Такий дизайн має перевагу в тому, що подібна камера може застосовуватися багаторазово, однак недоліком є висока вартість, складність конструкції, та все ще невирішена проблема випаровування середовища.

В ході роботи нами була спроектована камера для мікроскопії живих клітин у вигляді мікрослайду з алюмінію (рис. 3.3). Креслення було зроблено у програмі

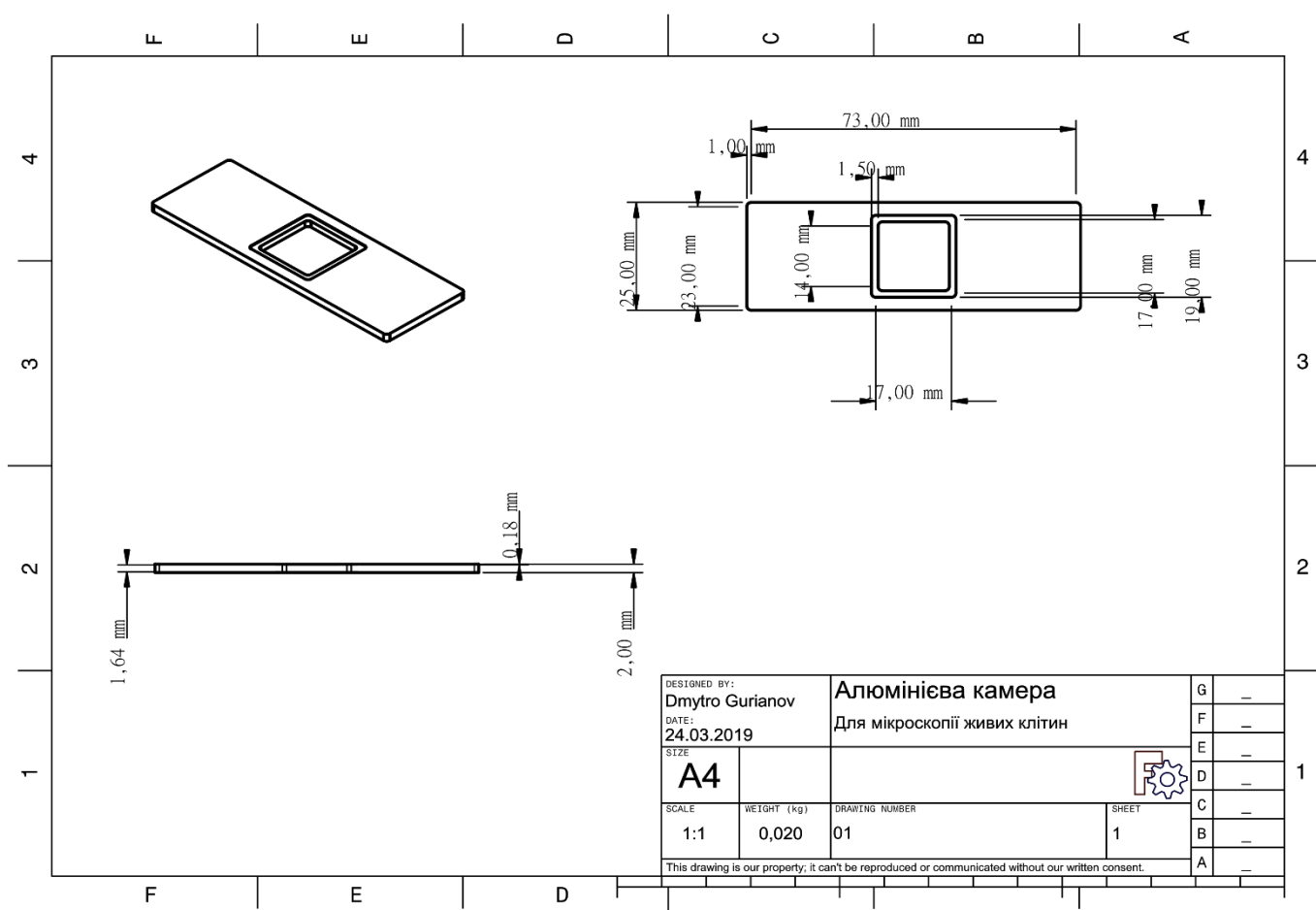


Рис. 3.3. Креслення алюмінієвої камери для мікроскопії живих клітин, зроблене в програмі FreeCAD. На кресленні зображено модель в площинах X-Y та Y-Z, а також ортогональна проекція

FreeCAD. Мікрослайди були виготовлені на замовлення за допомогою фрезувального станка з числовим програмним керуванням (ЧПК). Камера має розміри стандартного предметного скла, що застосовується в мікроскопії, тому для його використання

немає потреби встановлювати спеціальний предметний столик для кріплення культурального посуду. Посередині камери вирізаний наскрізний отвір розміром 14*14 мм, навколо якого заглиблення на 180 мкм відносно корпусу мікрослайду та розмірами 18.5*18.5 мм. За рахунок таких заглиблень покривне скло розмірами 19*19 мм поміщається з обох сторін камери, а між ними простір заповнюється 200-250 мкл поживного середовища. Клітини прикріплені до внутрішньої сторони покривного скла. Покривні скельця додатково герметизуються харчовою силіконовою змазкою, за рахунок чого середовище з камери не випаровується. Для запобігання взаємодії між поживним середовищем та алюмінієвим слайдом, камери було анодовано в 10% розчині сірчаної кислоти протягом год на льоду при постійній напрузі 17 В. В результаті на поверхні мікрослайдів утворився шар оксиду алюмінію товщиною близько 50 мкм, що забезпечує додаткову стійкість до корозії, механічних пошкоджень та покращує адгезію силіконової змазки. В результаті в спроектованій нами камері клітини можуть знаходитися щонайменше добу без втрати життєздатності за умови підтримання температури на рівні +37°C. Середовище з камери не випаровується. Камера є багаторазовою і стерилізується витриманням в 70% розчині етилового спирту перед використанням. Мікрослайди були нами використані для конфокальної флуоресцентної мікроскопії живих клітин.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковані у наступних роботах:

1. **Gurianov D.S.**, Antonenko S.V., Telegeev G.D. PH domain of BCR provides colocalization of full-length BCR with centrosome together with cortactin to facilitate actin-organizing function. *Biopolymers and cell.* 2021; 37(1): 3-13.
2. **Gurianov D.S.**, Antonenko S.V., Telegeev G.D Colocalization of BCR protein with clathrin, actin, and cortactin suggests its possible role in the regulation of actin branching and clathrin-mediated endocytosis. *Cytology and Genetics* 2021; 55(2): 152-161.

3.4. Залучення білка BCR та домену PH BCR до розгалуження актину та клатрин-опосередкованого ендоцитозу.

3.4.1. Співлокалізація кортактину та домену PH BCR у клітинах HEK293T.

Використовуючи епіфлуоресцентний мікроскоп Leica DM1000, нами було виявлено, що кортактин має в основному цитоплазматичну локалізацію, в той час як домен PH знаходиться як в цитоплазмі, так і в ядрі клітини. При цьому варто зазначити, що домен PH в ядрі розташований точково, тобто його розподіл не є рівномірний і, скоріш за все, прив'язаний до певних структурних елементів ядра. Співлокалізація між кортактином та доменом PH у клітинах, одночасно трансфікованих ECFP-C3-STTN та pmCitrine-PH, відбувалася в ділянці біля ядра клітини (рис. 3.4). При цьому на зразках, трансфікованих порожніми векторами pECFP-C3 та pmCitrine-C1 ми не спостерігали наявності точкової співлокалізації самих лише флуоресцентних білків з білками, злитими з флуоресцентними білками. Дані спостереження дозволяють зробити припущення, що домен PH та кортактин співлокалізуються в певному клітинному компартменті. Відомо, що основною функцією домена PH є зв'язування з фосфоінзитадами. В попередніх дослідженнях було показано, що домен PH білка BCR взаємодіє з фосфатидилінозитолами PI(3)P, PI(4)P і PI(5)P (6). Однак, попри це, домен PH часто зустрічається в складі багатьох сигнальних білків в геномі людини, що говорить про те, що його функція не обмежується зв'язуванням з фосфоінозитадами.

Кортактин відіграє важливу роль в розгалуженні актину в різних клітинних процесах. Він є важливим чинником агресивності росту солідних пухлин. Окрім цього він залучений в розгалуженні актину на початковій стадії клатрин-опосередкованого ендоцитозу. Варто уваги те, що в цьому процесі також задіяний білок динамін, що має власний домен PH. В цьому контексті важливо визначити, чи співлокалізуються кортактин та домен PH з клатрином. Це дозволить виявити, чи має місце залучення домену PH білка BCR до клатрин-опосередкованого ендоцитозу.

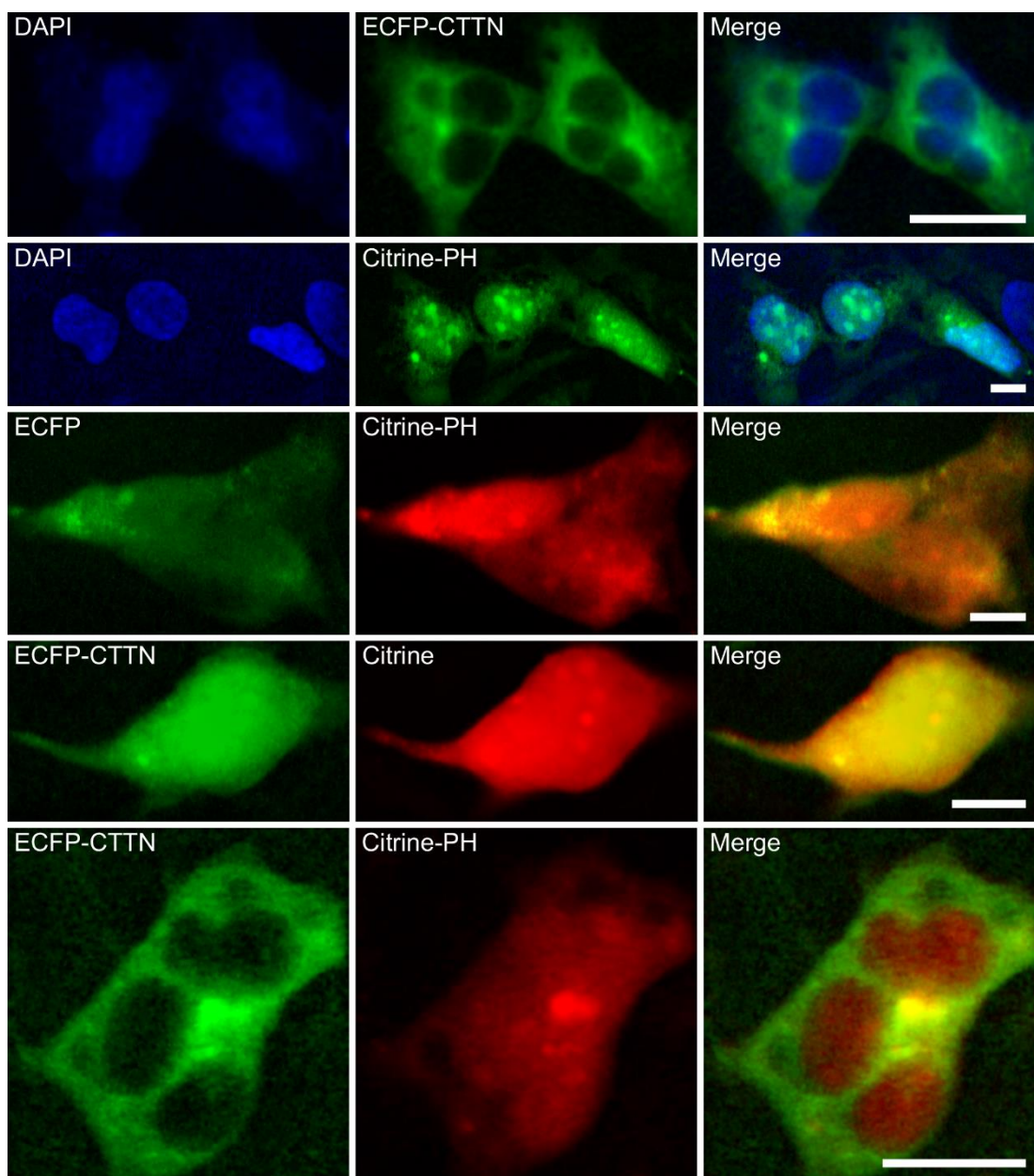


Рис. 3.4. Внутрішньоклітинна локалізація кортактину та домену PH білка BCR у клітинах HEK293T, трансфікованих векторами pmCitrine-C1-PH та ECFP-C3-CTTN, а також порожніми векторами pECFP-C3 та pmCitrine-C1 в якості негативних контролів. Масштаб – 10 мкм

3.4.2. Співлокалізація між кортактином, клатрином та BCR у клітинах HEK293T. Ми трансфікували клітини HEK293T конструкціями pECFP-C3-CTTN, pmCitrine-C1-PH та pmCherry-clathrin з метою визначення внутрішньоклітинної локалізації між кортактином, доменом PH білка BCR та клатрином. Нами було

виявлено потрійну співлокалізацію між доменом PH білка BCR, кортактином та клатрином у ділянках біля ядра клітини (рис. 3.5). При цьому домен PH на $53\pm 3,3\%$

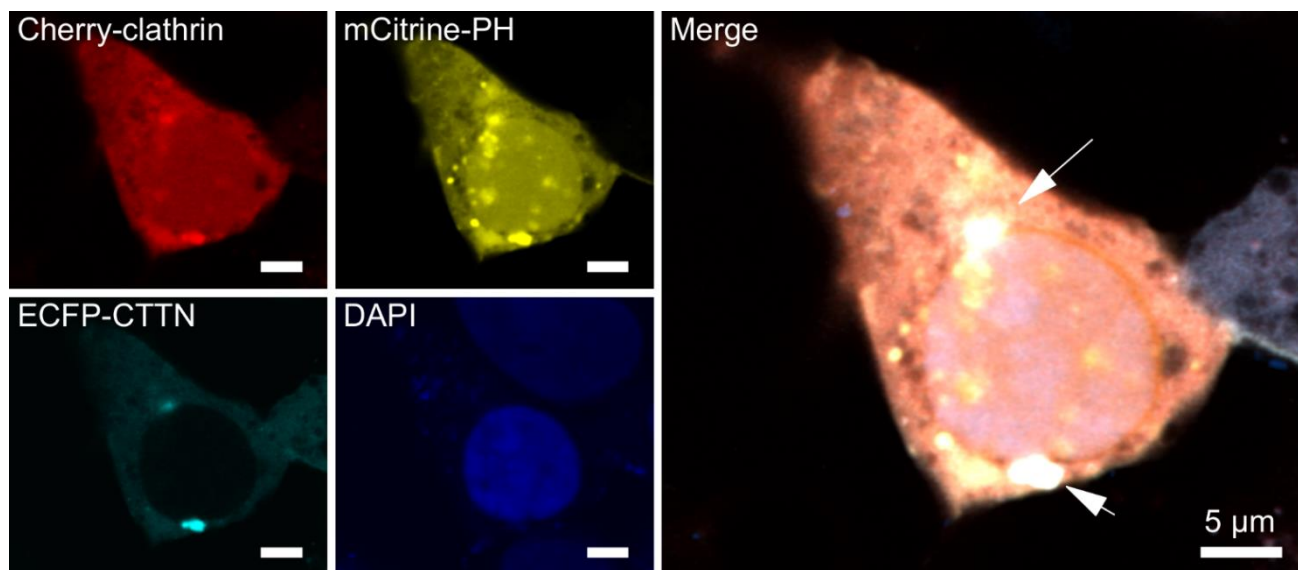


Рис. 3.5. Флуоресцентна конфокальна мікроскопія фіксованих клітин HEK293T, трансфікованих генетичними конструкціями ECFP-C3-CTTN, mCitrine-C1-PH, mCherry-clathrin та фарбованих DAPI. Стрілками показані точки співлокалізації між клатрином, кортактином та доменом PH біля ядра. Масштаб = 5 мкм

співлокалізується з клатрином, на $43,0\pm 1,3\%$ – з кортактином; кортактин на $63,0\pm 1,7\%$ співлокалізується з доменом PH та на $68,0\pm 2,0\%$ – з клатрином; частка клатрину, що співлокалізується з доменом PH та кортактином становить відповідно $60,0\pm 3,6\%$ та $52\pm 2,2\%$. Цікавим є також те, що ми виявили ядерну локалізацію клатрину на даному зображенні. З літератури відомо, що клатрин здатен транслокуватися в ядро в разі переходу його із тримерної форми, в якій він присутній на поверхні везикул, вкритих клатрином, у мономерну (138). В ядрі клатрин здатен активувати транскрипцію онкосупресорного білка p53. Також відомо, що клатрин здатен співлокалізуватися з центросомою, що може пояснювати його навколоядерну локалізацію (139). Клатрин може бути фосфорильований SRC кіназою по залишкам 1477 та 1497, а для забезпечення інтерналізації та поглинання рецепторів повинно відбутися його дефосфорильовання (140). Оскільки ABL та SRC можуть мати спільні

мішені, то ми припускаємо, що конститутивна тирозинкіназна активність BCR-ABL може призводити до порушення нормальної функції клатрину.

3.4.3. Співлокалізація кортактину, клатрину, та BCR у живих клітинах НЕК293Т. Відомо, що кортактин за рахунок взаємодії з Agr2/3 комплексом, здатен розгалужувати актин під час поглинання везикул, вкритих клатрином. Така подія повинна супроводжуватися комплексними перебудовами мембрани та актинового цитоскелета. За даними літератури, Abl частина білка BCR-ABL здатна взаємодіяти з актином за рахунок актин-зв'язувального домену. Однак мало що відомо про те, чи здатен білок BCR взаємодіяти з актином. Оскільки фіксація клітин іноді може порушувати структуру деяких органел та білків, важливо також визначити, чи відбувається задетектована в фіксованих клітинах співлокалізація також у живих клітинах. Для цього ми трансфікували живі клітини НЕК293Т конструкціями mCherry-clathrin та ECFP-BCR, а також пофарбували їх прижиттєвою міткою до актину – SiR-actin. В результаті нами було виявлено, що білок BCR здатен співлокалізуватися з клатрином у живих клітинах. Варто зазначити, що окрім точкових співлокалізацій, що, скоріш за все є везикулами, вкритими клатрином, ми спостерігали динамічну співлокалізацію між BCR та клатрином у досить великому компартменті (рис. 3.6). Ми припускаємо, що це може бути сортувальний комплекс Гольджі, в якому відбувається збирання ранніх ендосом. Раніше було показано, що білок BCR здатен взаємодіяти з білком GLG1, що локалізується в комплексі Гольджі, тому така роль BCR у сортуванні везикул є цілком імовірною. Було виявлено, що білок BCR на $16,0 \pm 2,3\%$ співлокалізується з клатрином та на $21,1 \pm 2,5\%$ — з актином. Частка клатрину, що співлокалізується з BCR, становить $11,8 \pm 2,2\%$, з актином – $29,5 \pm 2,1\%$. В той же час співлокалізація з актином має точковий характер та знаходиться в ділянках його розгалуження, про що свідчить той факт, що актин співлокалізується з BCR лише на $0,4 \pm 0,1\%$, а з клатрином – на $2,1 \pm 0,5\%$.

Таким чином, ми спостерігали динамічну співлокалізацію між актином та BCR в живих клітинах, а також співлокалізацію між клатрином та BCR в цитоплазмі клітин. Наступним етапом роботи було визначити, чи має місце співлокалізація між клатрином, кортактином та BCR на субдифракційному рівні, а також

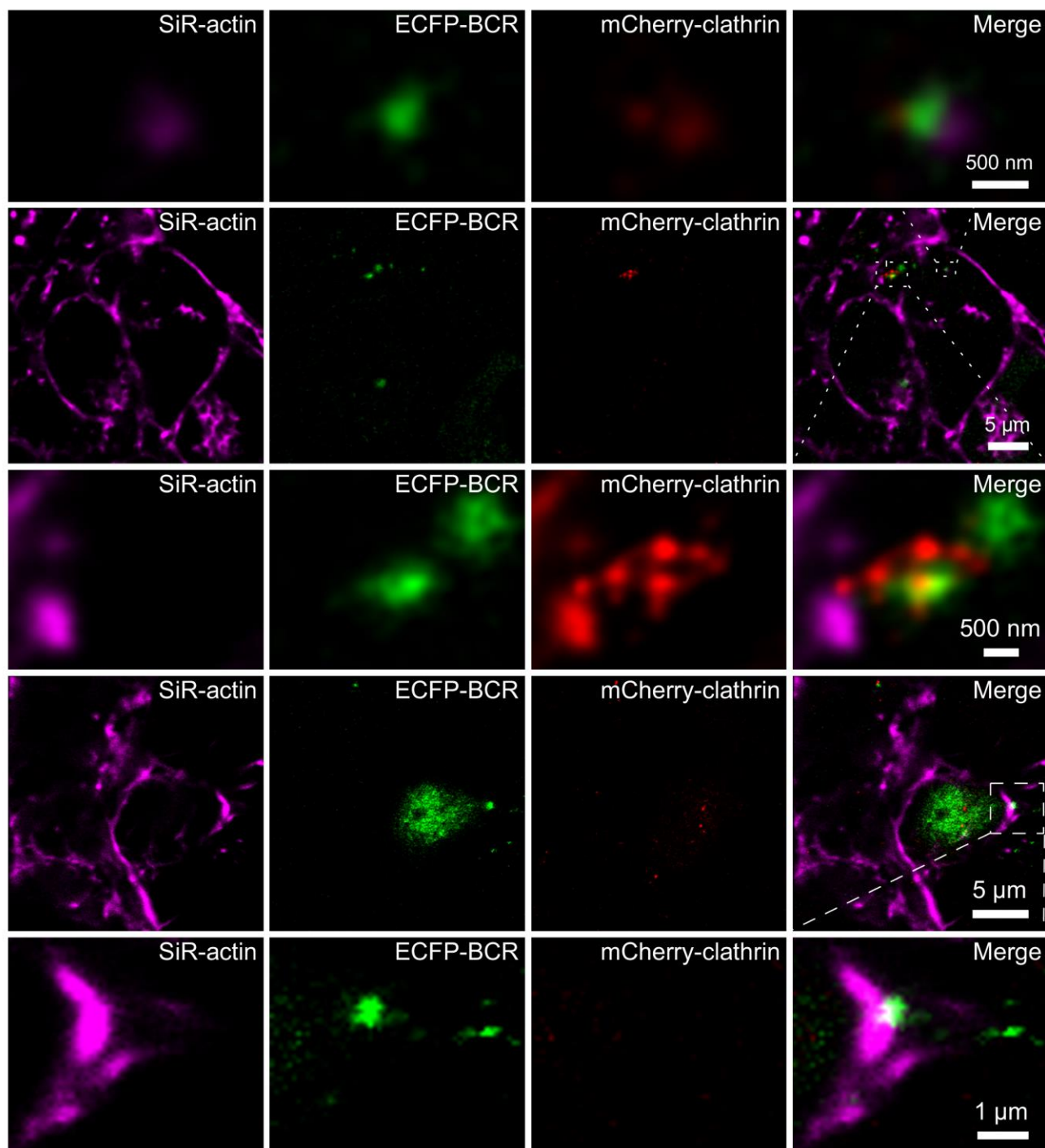


Рис. 3.6. Флуоресцентна конфокальна мікроскопія живих клітин HEK293T, забарвлених SiR-актином і трансфікованих mCherry-clathrin та ECFP-BCR. На збільшених ділянках показана співлокалізація білка BCR із клатрином та з ділянкою розгалуження актину в різних компартментах

ультраструктурні особливості внутрішньоклітинної локалізації домену PH білка BCR.

3.4.4. Ультроструктурні особливості внутрішньоклітинного розподілу домену РН в фіксованих клітинах НЕК293Т. Ми використали генетичну конструкцію рEGFP-РН для трансфекції клітин ссавців НЕК293Т та використання у мікроскопії STED. Ми отримали зображення розподілу домену РН надвисокої роздільної здатності (рис. 3.7). Структурно розподіл домену РН нагадував трискеліон,

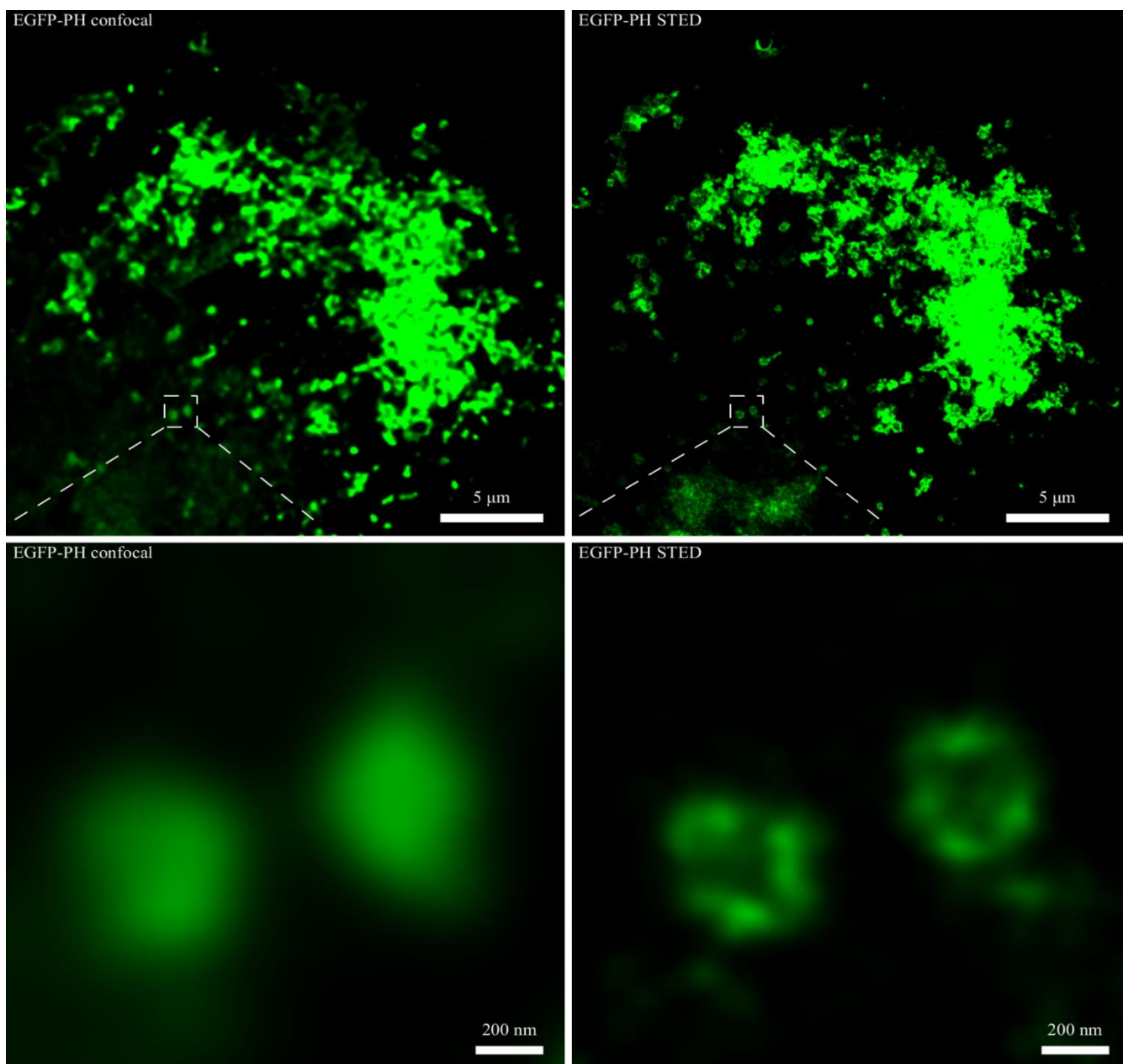


Рис. 3.7. Конфокальні та STED зображення фіксованих клітин НЕК293Т, трансфікованих конструкцією рEGFP-C3-РН. На збільшенні показано покращення роздільної здатності за рахунок використання STED мікроскопії та ідентифікація ультроструктур, що формує домен РН білка BCR

що є характерною особливістю для везикул, вкритих клатрином. Діаметр кільцевих структур, ідентифікованих за допомогою STED мікроскопії становить близько 200 нм. Діаметр везикул, вкритих клатрином, згідно літературних даних, становить в межах 100 – 200 нм. Таким чином, виявлені нами структурні особливості внутрішньоклітинного розподілу домену РН дозволяють висунути припущення, що домен РН може співлокалізуватися з клатриновими везикулами за рахунок білок-білкової взаємодії з клатрином, або через властивість зв'язуватись з фосфоліпідами.

3.4.5. Потрійна співлокалізація між клатрином, BCR та кортактином виявлена за допомогою мікроскопії надвисокої роздільної здатності. Попередньо за допомогою звичайної конфокальної мікроскопії ми виявили, що домен РН здатен співлокалізуватися з клатрином та кортактином у фіксованих клітинах HEK293T. Флуоресцентна конфокальна мікроскопія має обмеження дифракції та не дозволяє відрізнити окремі об'єкти, що знаходяться ближче один до одного ніж половина довжини хвилі флуорофора. Таким чином, ми не можемо дискримінувати об'єкти, що знаходяться ближче один до одного ніж 200-300 нм. Оскільки біологічно важливі взаємодії можуть відбуватися на меншій відстані, то важливим є подолання цього бар'єру. Для цього ми використали мікроскопію надвисокої роздільної здатності – стимульоване виснаження випромінювання (**Stimulated emission depletion – STED**). Середня роздільна здатність STED мікроскопії становить 40 нм, а в найкращому випадку – 20 нм. Використання мікроскопії надвисокої роздільної здатності дозволить визначити особливості утворення комплексів між ними. Нами було отримано зображення фіксованих клітин K562, трансфікованих конструкцією pEGFP-clathrin та забарвлених антитілами до кортактину та BCR. Ми виявили наявність потрійної співлокалізації між клатрином, кортактином та BCR як в конфокальних зображеннях, так і в зображеннях надвисокої роздільної здатності (рис. 3.8). Ми виявили, що на конфокальному зображенні частка клатрину, що співлокалізується з кортактином, становить $19,5 \pm 1,7\%$, з BCR – $71,0 \pm 3,5\%$, в той час як відповідні значення на STED зображенні становили відповідно $35,6 \pm 2\%$ та $85,6 \pm 1,9\%$. Співлокалізація кортактину з BCR та клатрином на конфокальних зображеннях становила $86,6 \pm 2,8\%$ та $54,5 \pm 2,6\%$, для STED зображень ці значення становили

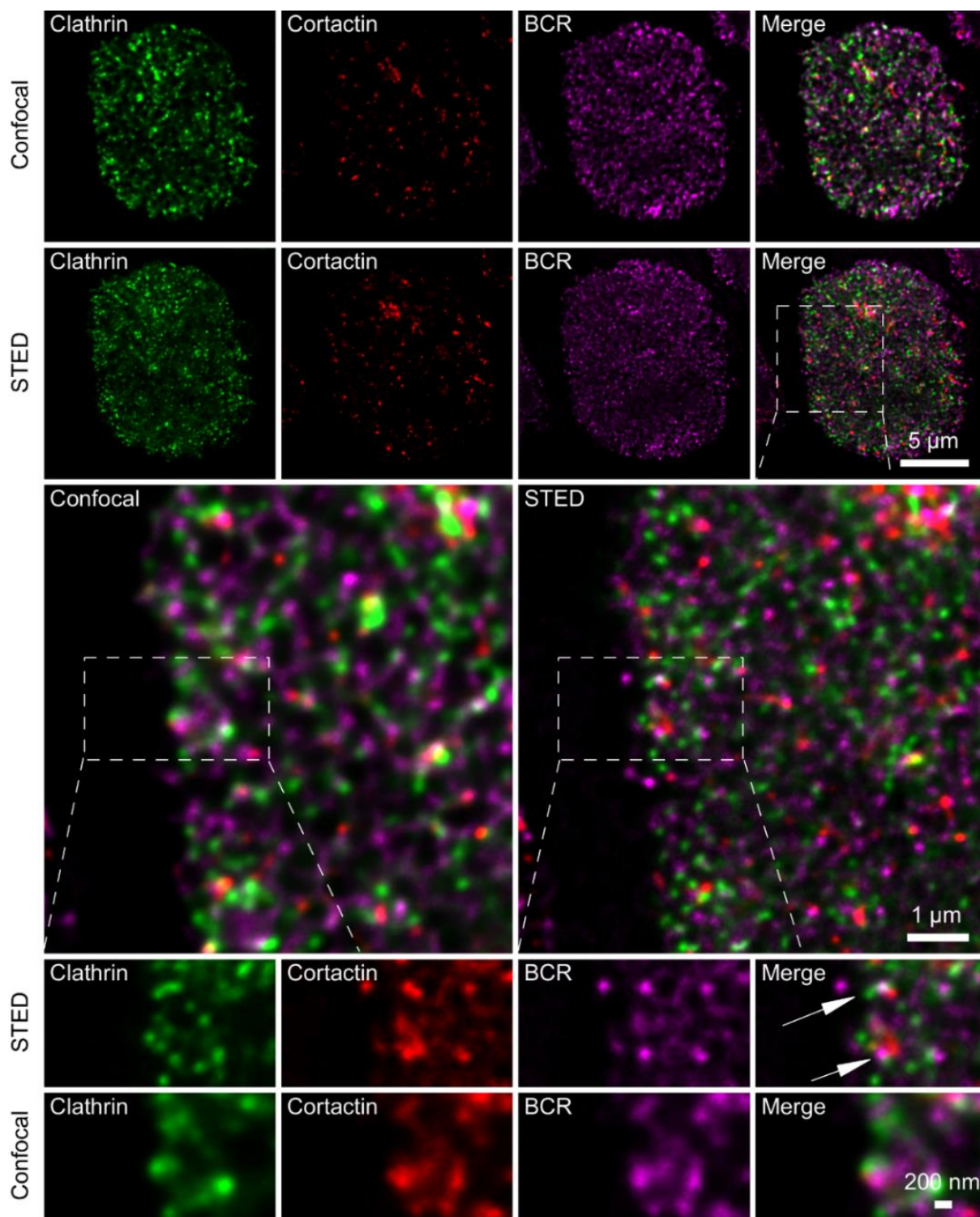


Рис. 3.8. Флуоресцентна конфокальна та STED мікроскопія фіксованих клітин K562, трансфікованих EGFP-Clathrin та забарвлених антитілами до BCR та кортактину. Стрілки на збільшеній ділянці вказують на ультраструктури в місцях потрійної співлокалізації BCR, кортактину та клатрину, виявлені мікроскопією надвисокої роздільної здатності

відповідно $76,0 \pm 2,3\%$ та $54,2 \pm 3,3\%$. Значення співлокалізації BCR з кортактином та

клатрином на конфокальних зображеннях становили $18,1 \pm 2,5\%$ та $35,6 \pm 1,9\%$, відповідні значення для STED зображень – $38,4 \pm 3,9\%$ та $57,0 \pm 4,7\%$. Різниця у співлокалізації кортактину з клатрином між конфокальним та STED зображенням не була статистично значущою ($p=0,946$). Ми зафіксували зниження співлокалізації кортактину з BCR на 10% ($p<0,05$). В той же час частка клатрину, що співлокалізується з кортактином та BCR, та частка BCR, що співлокалізується з клатрином та кортактином, збільшилася і є статистично достовірною ($p<0,05$). Збільшення частки співлокалізації у зображеннях надвисокої роздільної здатності порівняно з конфокальними говорить про залучення BCR до клатрин-опосередкованого ендоцитозу. Виявлені нами ультраструктури ідентифікують BCR як лінкер між кортактином та клатрином. Таким чином, ми припускаємо, що BCR бере участь у Arp2/3-залежному поглинанні клатринових везикул у тандемі з кортактином. Важливу роль імовірно відіграє домен PH білка BCR, який зв'язуючись з мембраною координує її перебудову в тандемі з кортактином, який регулює розгалуження актинового цитоскелету. Для виявлення можливого залучення білка BCR в розгалуження актину нам необхідно було визначити чи співлокалізується BCR з кортактином саме в місцях розгалуження актинових філаментів.

3.4.6. Співлокалізація білка BCR з точками розгалуження актинових філаментів. Для того щоб перевірити, чи здатен білок BCR у тандемі з кортактином розгалужувати актин ми використали клітинну лінію K562 та обробили її анти-BCR та анти-СТТН антитілами, а також пофарбували актин фалоїдином, кон'югованим з FITC, та забарвили ядро DAPI. Ми виявили співлокалізацію між кортактином та BCR в точці розгалуження актину на периферії клітини в примембранній ділянці (рис. 3.9). Частка BCR, що співлокалізується з кортактином та актином становить відповідно $40,7 \pm 2,9\%$ та $56,5 \pm 2,2\%$, кортактин на $83,7 \pm 1,2\%$ співлокалізується з BCR, та на $88,3 \pm 1,9\%$ — з актином, актин співлокалізується з BCR та кортактином із значеннями коефіцієнтів Мандерса $67,6 \pm 11,2\%$ та $52,9 \pm 5,1\%$ відповідно. Співлокалізація BCR та кортактину в точках розгалуження актину в примембранній ділянці клітин K562 говорить про те, що вони можуть приймати участь у мембранно-цитоскелетній перебудові, необхідній для таких процесів як поглинання везикули під час клатрин-

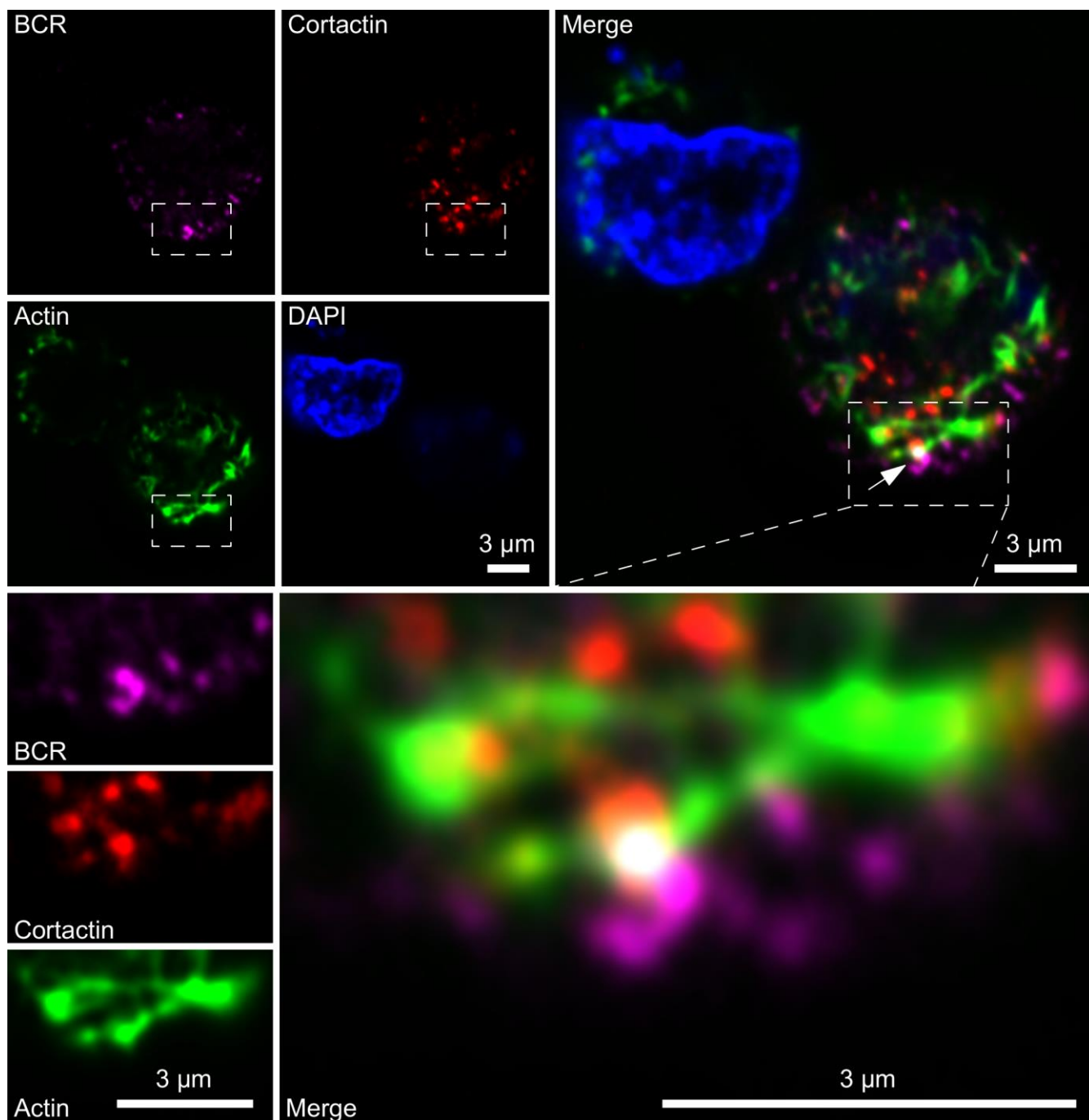


Рис 3.9. Конфокальне зображення фіксованих клітин K562, забарвлених антитілами до BCR та кортактину, фалоїдином-FITC та DAPI. На збільшених ділянках показано співлокалізацію BCR та кортактину в точках розгалуження актину в примембранній ділянці. Масштаб – 3 мкм

опосередкованого ендцитозу. Для підтвердження результатів отриманих за допомогою конфокального мікроскопа, ми використали STED мікроскопію фіксованих клітин K562, мічених антитілом до BCR та фалоїдином, кон'югованим з

міткою АТТ0647N. Ми визначили співлокалізацію BCR за актином в точках його розгалуження (рис. 3.10). Розмір ділянок такої співлокалізації становить приблизно

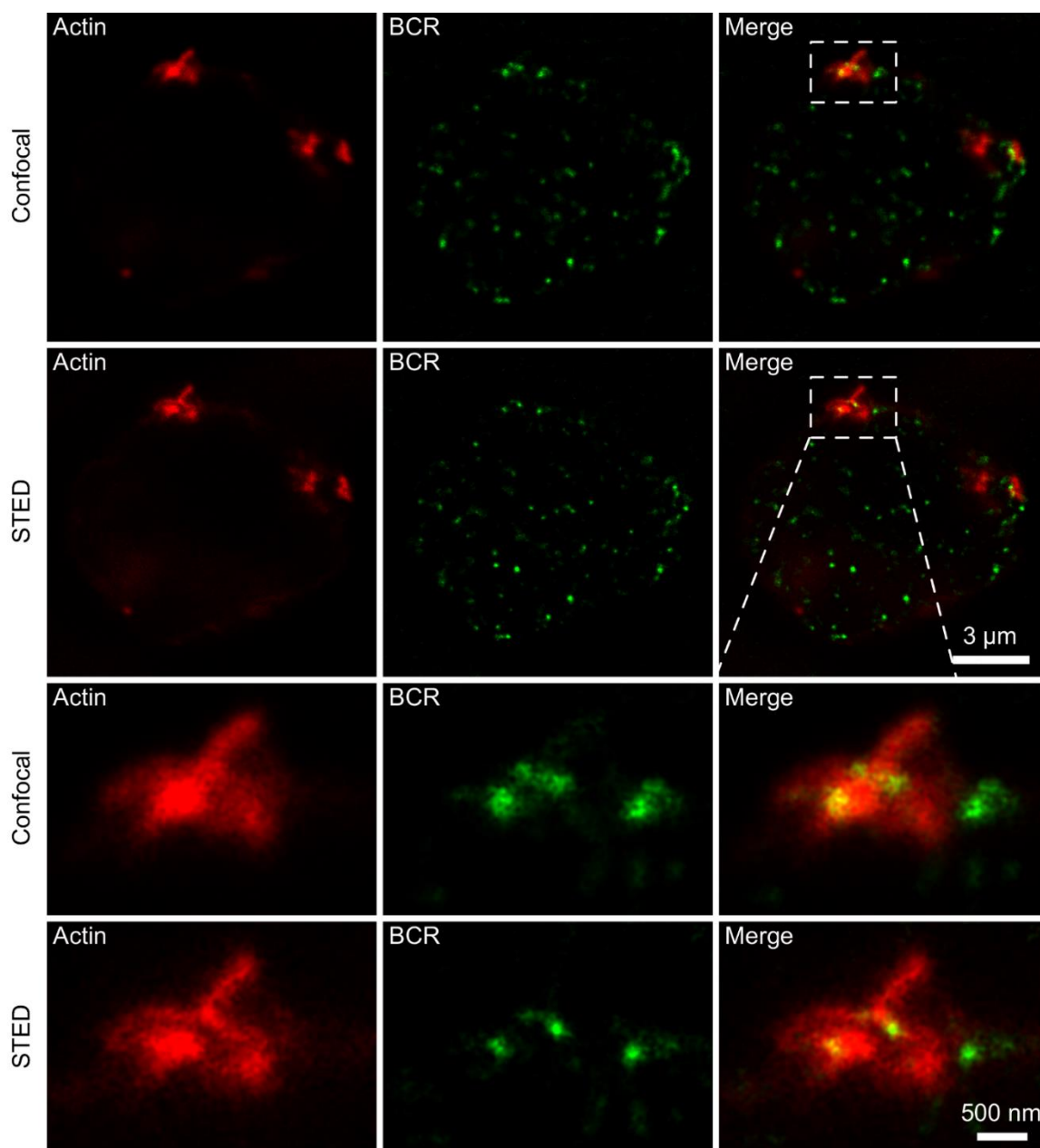


Рис. 3.10. Конфокальні та STED-зображення фіксованих клітин K562, забарвлених анти-BCR антитілами та фалоїдином, міченим АТТ0647N. На збільшених ділянках показано покращення роздільної здатності STED зображення порівняно з конфокальним та ідентифікована точка співлокалізації BCR з ділянками розгалуження актину

80-100 нм. Виявлено, що BCR на $76,7 \pm 2,9\%$ співлокалізується з актином на

конфокальному зображенні, та на $44 \pm 7,2\%$ — на STED зображенні, в свою чергу актин співлокалізується з BCR на $54,5 \pm 7,3\%$ на конфокальному зображенні, та на $45,2 \pm 7,2\%$ $54,5 \pm 7,3\%$ на STED. Зменшення частки BCR, що перекривається з актином у STED зображенні порівняно з конфокальним, є статистично значущим ($p < 0,05$). Статистично значущої різниці між часткою актину, що перекривається з BCR, для STED та конфокального зображення не виявлено ($p = 0,417$). Нам вдалося виявити більш деталізовану ділянку співлокалізації між BCR та актином, що знаходиться в ділянках розходження актинових філаментів, що пояснює зниження рівня співлокалізації для зображення надвисокої роздільної здатності порівняно з конфокальним. Розгалуження актину в місцях фокальної адгезії забезпечується кортактином. Тому базуючись на отриманих нами даних по співлокалізації BCR з точками розгалуження актину, ми вирішили перевірити, чи співлокалізується домен PH білка BCR з кортактином в ділянках кріплення клітин HEK293T до субстрату. Ми спостерігали високий рівень співлокалізації між кортактином та доменом PH білка BCR: домен PH співлокалізується з кортактином на $88,4 \pm 2,5\%$, а кортактин співлокалізується з доменом PH на $98,4 \pm 0,4\%$ (рис. 3.11).

Ці дані можуть свідчити про залучення домену PH білка BCR до формування фокальної адгезії. Порушення фокальної адгезії може призводити до дерегуляції інтегринового сигналювання, тому виявлена нами співлокалізація розширює наші знання про імовірні шляхи онкогенезу при ХМЛ.

Отримані дані на живих та фіксованих клітинах, а також з використанням мікроскопії надвисокої роздільної здатності STED дозволяють стверджувати, що BCR залучений в процесі поглинання везикул, вкритих клатрином за участі кортактину, а також потенційно співлокалізується з ранньою ендосомою. Ми припускаємо, що в ці процеси активно залучений домен PH білка BCR, який разом з кортактином координує мембранно-цитоскелетну перебудову.

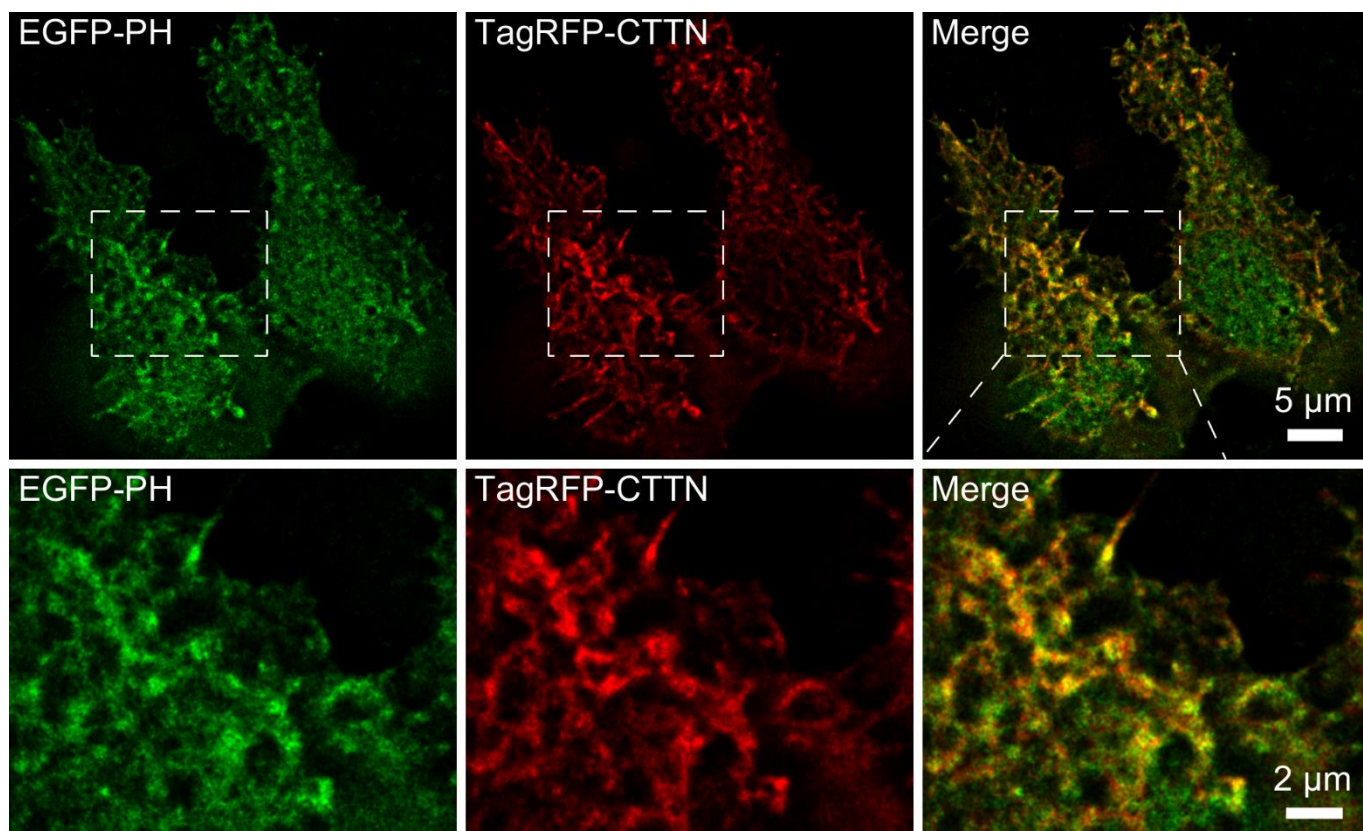


Рис. 3.11. Конфокальна мікроскопія живих клітин HEK293T, EGFP-PH та TagRFP-CTTN. На збільшених зображеннях показана співлокалізація домену PH білка BCR та кортактину у імовірних ділянках фокальної адгезії

Результати, викладені у підрозділі, опубліковані у наступних роботах:

1. **Gurianov D.S.**, Antonenko S.V., Telegeev G.D Colocalization of BCR protein with clathrin, actin, and cortactin suggests its possible role in the regulation of actin branching and clathrin-mediated endocytosis. *Cytology and Genetics* 2021; 55(2): 152-161.

2. **Gurianov D.S.**, Antonenko S.V., Telegeev G.D. PH domain of BCR provides colocalization of full-length BCR with centrosome together with cortactin to facilitate actin-organizing function. *Biopolymers and cell.* 2021; 37(1): 3-13.

3. Антоненко С, Гур'янов Д, Кравчук І, Телегєєв Г. Аналіз клітинної локалізації PH домена Bcr-Abl з білком USP1 та розробка програми для

оцінки їх сайтів фосфорилування. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2018; 22: 90-95.

4. Антоненко С, Кравчук І, **Гур'янов Д**, Телегєєв Г. Білки партнери PH домену протеїна Bcr-Abl: створення генетичних конструкцій для виявлення молекулярних особливостей розвитку ХМЛ. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017; 20: 47-52.

5. **Gurianov D**, Antonenko S, Telegeev G Colocalization of cortactin and PH domain of BCR in HEK293T cells and its potential role in cell signaling Biopolymers and cell. 2016; 32(1): 26-33.

6. **D. Gurianov**, S. Antonenko, G. Telegeev Creating genetic constructs for determining spatio-temporal distribution of cortactin and the PH domain of BCR in mammalian cells Exp Oncol 2018, 40 (2): 159-160

7. **Gurianov D.**, Telegeev G. Super-resolution imaging of intracellular distribution of PH domain of BCR in HEK293T cells BASEL LIFE 2018. Abstract Book. - P64

8. **Gurianov D**, Antonenko S, Telegeev G. Possible role of PH domain of Bcr in molecular pathways that determine the phenotype of myeloproliferative disorder in Bcr-Abl positive leukemias. LIMSC – 10th Leiden International (Bio) Medical Student Conference Abstract book; 2017, – p 84.

9. Antonenko S, **Gurianov D**, Kravchuk I, Telegeev G. Role of USP1, CORTACTIN and HSP27 proteins in molecular mechanisms that affect CML development. International Scientific Conference Normal and cancer stem cells: discovery, diagnosis and therapy; 2017 October 5–6, Kyiv, Ukraine.

10. **Gurianov D**, Antonenko S, Kravchuk I, Telegeev G. Colocalization analysis shows that PH domain of BCR may play role in proteasomal degradation and clathrin-mediated endocytosis through proteins CTTN and USP1, but unlikely to influence cell adhesion. 41th FEBS congress; 2016 September 3-8, Kuşadası, Turkey.

11. Антоненко С, **Гурянов Д**, Кравчук І, Телегєєв Г. Колокалізація USP1 і CTTN із PH доменом онкобілка та їх роль у розвитку ХМЛ. XIII з'їзд онкологів та радіобіологів України; 2016 травень 26-28, Київ, Україна. 189-190

12. **Gurianov, D. S.**, Antonenko, S. V., Telegeev, G. D. Colocalization analysis shows the role of PH domain of BCR in proteasomal degradation and clathrin-mediated endocytosis *Acta Biochimica Polonica*, 2016; 63: 60

13. **Gurianov D. S.**, Antonenko S. V., Kravchuk I.V., Telegeev G. D. Cellular localization of β -tubulin, cortactin and PH domain of BCR, and their potential role in signalling pathways and clathrin-mediated endocytosis 12th International Congress of Cell Biology Abstract Book. 2016; 154

3.5. Співлокалізація білка BCR з кортактином у ядрі клітини.

В попередніх результатах було продемонстровано, що кортактин та BCR співлокалізувалися у різних цитоплазматичних структурах – примембранній та навколоядерній ділянці. При цьому, за нашими спостереженнями у більшості клітин кортактин мав виключно цитоплазматичну локалізацію, однак незначна частка клітин все ж містила кортактин в ядрі клітини. Оскільки BCR та його домен PH мали як цитоплазматичне, так і ядерне розташування, цікаво було визначити, чи існує можливість співлокалізації між BCR та кортактином в ядрі. Нам вдалося виявити таку співлокалізацію в живих клітинах HEK293T (рис. 3.12). Ці клітини знаходилися на

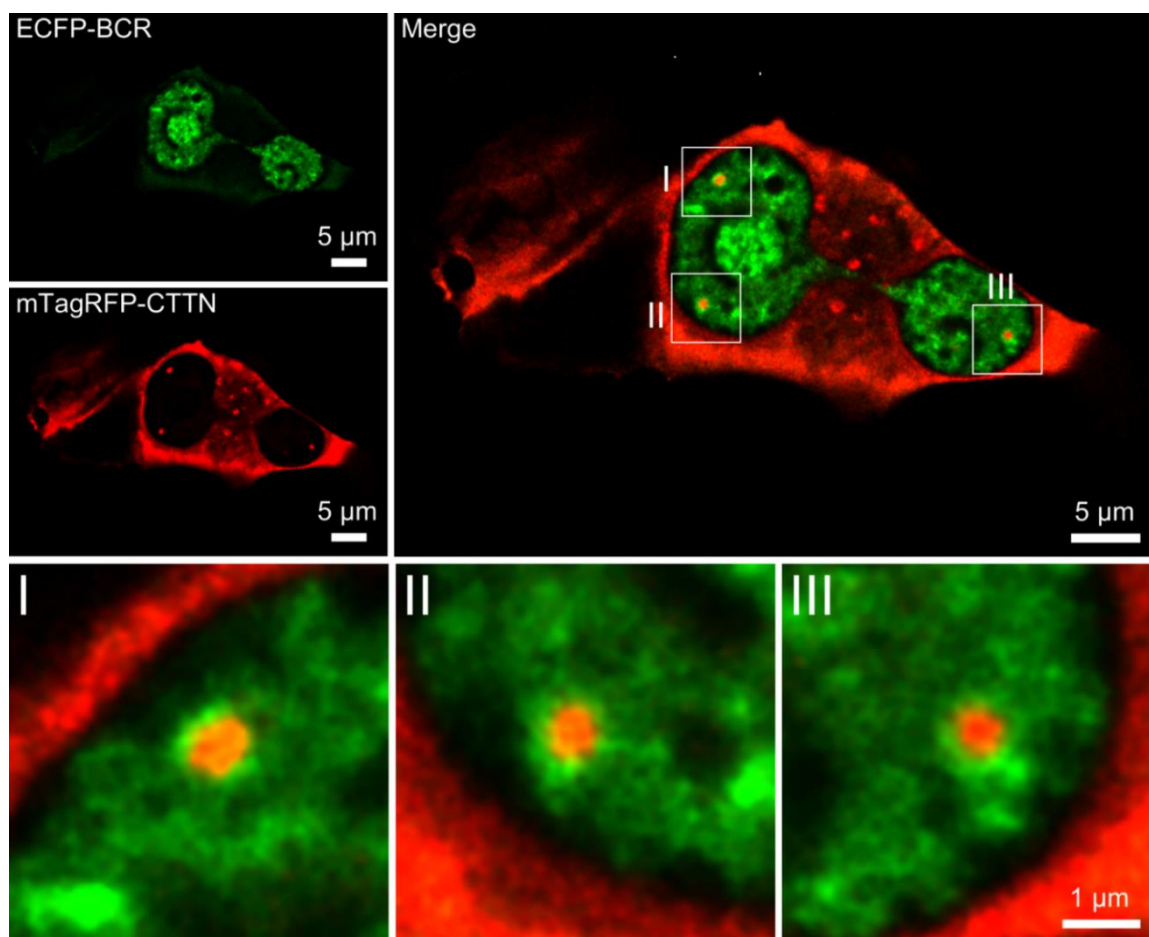


Рис. 3.12. Конфокальна мікроскопія живих клітин HEK293T, трансфікованих конструкціями ECFP-BCR та mTagRFP-N1-CTTN, які знаходяться на термінальній стадії поділу. I-III – збільшені ділянки співлокалізації між BCR та кортактином у ядрі, де BCR формує кільце навколо точок локалізації кортактину

термінальній стадії клітинного поділу, про що свідчить наявність перетяжки між ядрами. В ядрі клітини BCR утворює пояс навколо точок локалізації кортактину. При цьому така співлокалізація є точковою, про що свідчать низькі значення коефіцієнтів Мандерса, згідно яким BCR на $3,2 \pm 0,7\%$ перекривається з кортактином, а кортактин перекривається з BCR на $5,7 \pm 1\%$. Якщо порівняти ці значення з тими, що були отримані для клітин які не знаходилися в стадії поділу (рис. 3.5, 3.8, 3.9, 3.11), то для клітин, що діляться, зафіксовано статистично достовірне зниження співлокалізації між кортактином та BCR ($p \leq 0,05$). Цікаво зазначити, що при цьому BCR знаходиться переважно в ядрі і практично відсутній в цитоплазмі клітини, в той час як переважна більшість кортактину знаходиться в цитоплазмі, і лише невелика його частка – в ядрі. В ядрі BCR та кортактин співлокалізуються утворюючи певну характерну структуру – кортактин знаходиться в центрі цієї структури, в той час як BCR формує навколо нього оболонку. Про функції кортактину в ядрі відомо мало, окрім того, що його потрапляння туди забезпечується ацетилюванням з боку білка Keap1 у відповідь на оксидативний стрес (141). Так як в ядрі присутні білки родини Agr, подібні до тих, що формують Agr 2/3 комплекс, ми припускаємо, що співлокалізація BCR та кортактину в ядрі може бути необхідною для регуляції розгалуження ядерного актину, який, за даними літератури, забезпечує підтримання комплексів ремоделювання хроматину, участь у транскрипції, зв'язування з рибонуклеопротейнами, репарації ДНК та організації хроматину в ядрі (142).

Отримані дані дозволяють говорити про те, що кортактин разом з BCR можуть відігравати важливу роль у функціях ядра клітини, таких як регуляція транскрипції, підтримання структурної організації хроматину, репарації ДНК, тощо, підтримання цілісності яких є особливо важливою на етапі клітинного поділу.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковані у наступних роботах:

1. **Gurianov D.S.**, Antonenko S.V., Telegeev G.D Nuclear localization of BCR and cortactin indicates their potential role in regulation of actin branching in nucleus. *Experimental Oncology* 2021; 43(1): 73-76.

3.6. Співлокалізація білка BCR та домену PH BCR з тубуліном та центром організації мікротрубочок.

3.6.1. Роль домену PH у співлокалізації BCR з кортактином у центросомі.

Співлокалізація між кортактином та BCR може мати місце в ділянках біля ядра клітини (рис.3.5). Одним із кандидатів, для яких характерна подібна структура є центр організації мікротрубочок (центросома). Центросома бере участь у формуванні веретена поділу (143). Порушення функції центросом є характерним для багатьох типів раку (144). В попередніх дослідженнях одним із кандидатів на взаємодію з доменом PH білка BCR є β -тубулін (6). Для того, щоб визначити, чи співлокалізується білок BCR з тубуліном, або центросомою, ми використали барвник SiR-tubulin, що являє собою силікон родамін кон'югований з доксетацилом – протипухлинним препаратом, який здатен зв'язуватися з мікротрубочками. Особливістю цього барвника є те, що він може зв'язуватися як з мікротрубочками, які складаються з субодиниць α - та β -тубуліну (145), та з центросомною ділянкою, що складається переважно з γ -тубуліну (146). Однак даний барвник може використовуватися лише для забарвлення живих клітин, він втрачається при фіксації. Ми виявили, що в клітинах HEK293T білок BCR та кортактин співлокалізуються з центросомною ділянкою, яка має вигляд двох точок, від яких розгалужуються мікротрубочки (рис. 3.13). При чому така співлокалізація відбувалася в динаміці протягом певного періоду часу (приблизно 80 с). Частка білка BCR, що співлокалізується з кортактином та тубуліном, становить відповідно $62,0 \pm 2,8\%$ та $27,6 \pm 3,2\%$. Частка кортактину, що перекривається з BCR та тубуліном становить $87,8 \pm 1,4\%$ та $32,6 \pm 4,8\%$ відповідно. Тубулін співлокалізується з BCR та кортактином із відповідними значеннями $63,7 \pm 4,1\%$ та $40,5 \pm 3,6\%$. В якості негативного контролю ми використали порожній вектор рЕСFP-С3, що експресує зелений флуоресцентний білок. В контрольних зразках ЕСFP співлокалізувався із кортактином та тубуліном із значеннями $0,8 \pm 1\%$ та $11,5 \pm 2,6\%$, які є достовірно нижчими ніж у експериментальних зразках ($p < 0,05$). Значення співлокалізації кортактину та тубуліну з ЕСFP становили відповідно $29,2 \pm 3,5\%$ та $16,2 \pm 2,7\%$, що також є достовірно нижчими показниками у порівнянні з

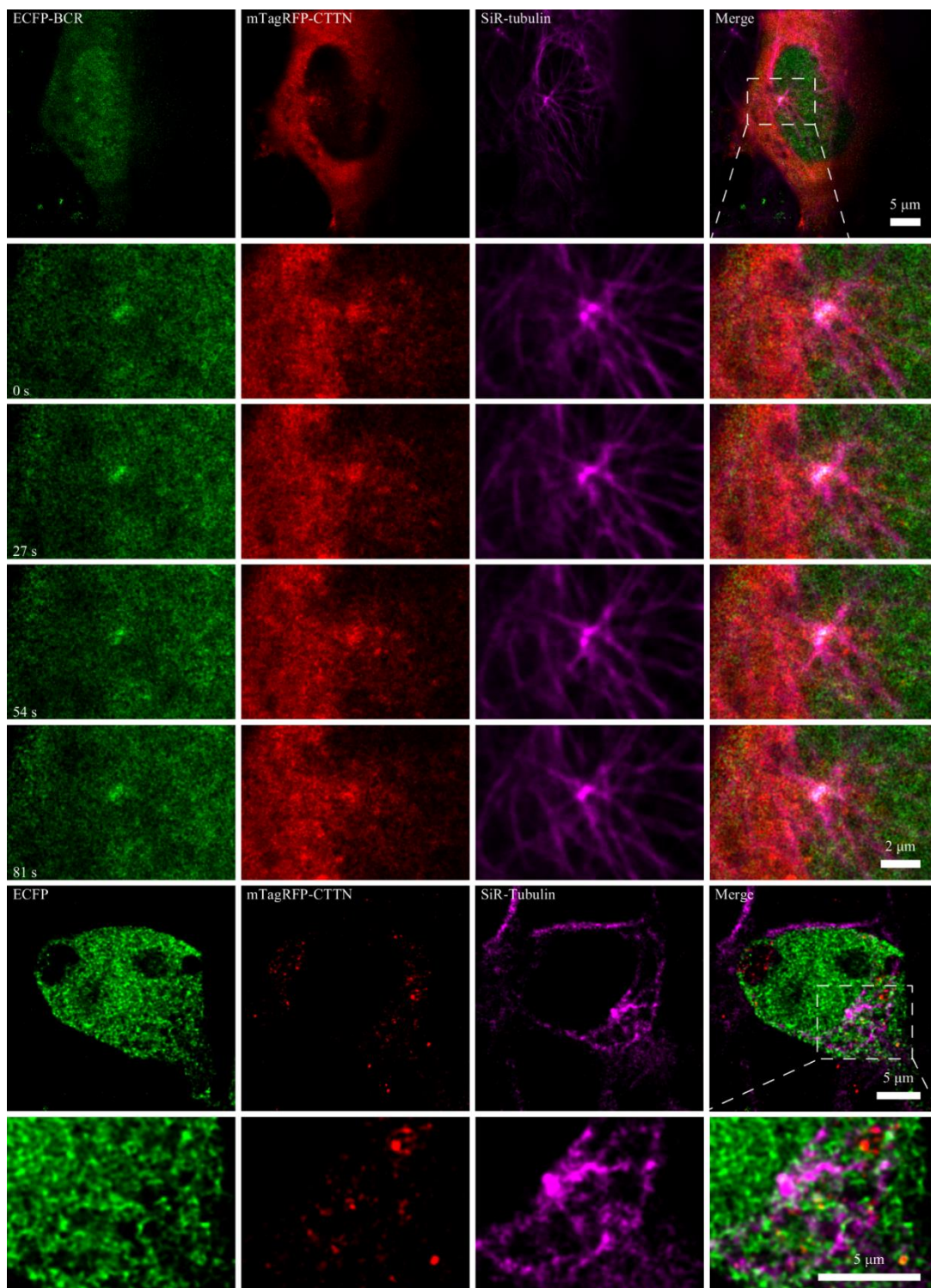


Рис 3.13. Конфокальна мікроскопія живих клітин HEK293T у часовій динаміці, трансфікованих генетичними конструкціями pECFP-BCR, pECFP, pmTagRFP-N1-CTTN та забарвлених SiR-Tubulin. На збільшених зображеннях показана центросомна ділянка для контрольних зразків, трансфікованих порожнім вектором ECFP, та експериментальних зразків, трансфікованих pECFP-BCR

відповідними показниками для ECFP-BCR ($p < 0,05$). Таким чином, не було виявлено

співлокалізації між білком ЕСFP та кортактином у центросомній ділянці. Білок ЕСFP був рівномірно розподілений по всій клітині. Відомо, що нуклеація тубулінових філаментів відбувається в центросомі. Центросома складається з великої кількості білків, які називають перицентріолярним матеріалом, а також формує дві центріолі, розташовані одна до одної під кутом 90° . Центріолі дають початок мікротрубочкам і складаються з γ -тубуліну та 9 триплетів димерів α - та β тубуліну, що здатні полімеризуватися за рахунок ГТФ-залежного процесу. Центросома забезпечує формування веретена поділу, а також виконує важливу роль у регуляції полімеризації мікротрубочок (143). Порушення функції центросом часто є маркером онкотрансформації клітини (147), тому виявлена нами співлокалізація BCR та кортактину з центросомною ділянкою дозволяє припустити, що заякорювання химерного білка BCR-ABL до центросоми забезпечується саме BCR частиною білка. При такому сценарії аномальне фосфорилування кіназою ABL центросомних білків може призводити до порушення нормального функціонування центросоми. Окрім цього, співлокалізація кортактину з центросомою говорить про його потенційну участь у розгалуженні актину і його активацію онкобілком BCR-ABL за рахунок фосфорилування. Оскільки, за літературними даними центросома є також центром організації актину, то подібні порушення нормального перебігу розгалуження актину можуть також вносити свій внесок в онкогенез. В подальшому необхідно було визначити, чи домен PH відіграє роль в заякорюванні білка BCR в центросомній ділянці. Живі клітини HEK293T було трансфіковано генетичними конструкціями pEGFP-C3-PH, pmTagRFP-N1-CTTN та пофарбовано барвником SiR-Tubulin. Ми отримали зображення клітин з конфокального флуоресцентного мікроскопа у вигляді зрізів по осі z. Виявили, що домен PH та кортактин співлокалізуються з тубуліном в навколоядерній ділянці (рис. 3.14). Частка EGFP-злитого домену PH, що співлокалізується з кортактином становить $34,2 \pm 4,9\%$, з тубуліном – $12,9 \pm 2,0\%$. Кортактин співлокалізується з доменом PH та тубуліном із значеннями коефіцієнтів Мандерса відповідно $62,6 \pm 4,3\%$ та $54,1\% \pm 7,5\%$. Значення відсотка співлокалізації

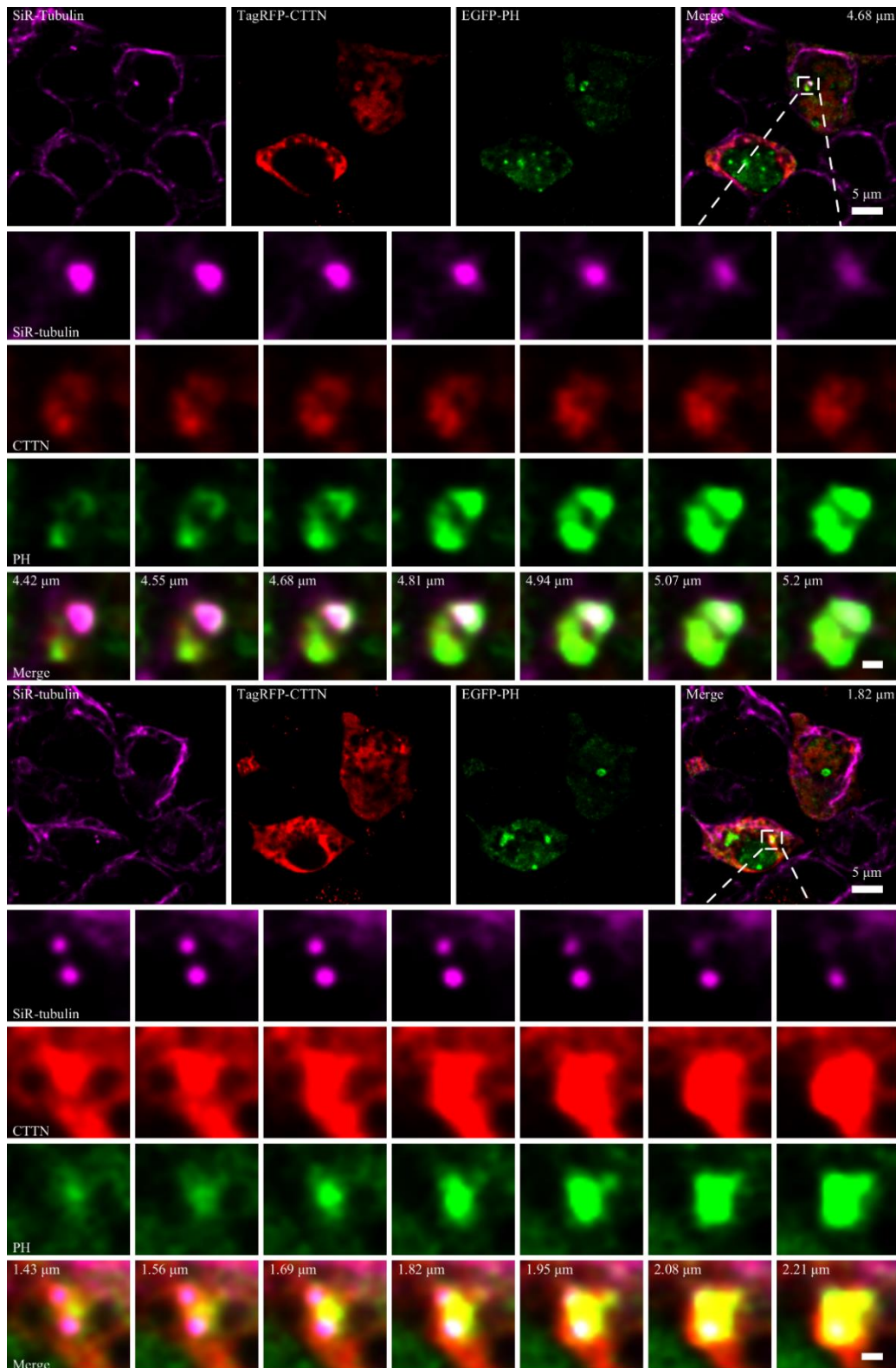


Рис 3.14. Конфокальна мікроскопія живих клітин HEK293T, трансфікованих рEGFP-C3-PH, рmTagRFP-N1-CTTN та забарвлених SiR-Tubulin. На збільшених зображеннях – z-зрізи центросомних ділянок, в яких зафіксовано співлокалізацію домену PH та кортактину. Масштаб на збільшених зображеннях – 500 нм

тубуліну з доменом PH та кортактином становлять відповідно $35,4 \pm 1,5\%$ та

60,1±6,4%. Цікавим спостереженням, яке вдалося отримати в результаті аналізу різних зрізів зображення виявилось те, що розподіл кортактину та домену РН вздовж центросомної ділянки є нерівномірним. Спочатку з'являється скупчення кортактину, після чого з'являється домен РН та центросома. Такий нерівномірний розподіл може свідчити про можливість участі домену РН та повнорозмірного BCR у структуроутворюючих функціях центросоми. Така співлокалізація мала місце протягом 800 нм по осі z, що є досить великою структурою в масштабах клітини. Таким чином можна стверджувати, що саме домен РН білка BCR необхідний для його співлокалізації з центросомою, оскільки ізольований від інших частин білка BCR домен РН здатен співлокалізуватися з центросомою та кортактином.

3.6.2. Співлокалізація онкобілка BCR/ABL з γ -тубуліном в навколоядерній ділянці розгалуження актину. Окрім центру організації мікротрубочок є дані, що центросома також є центром організації актину (148). В цьому контексті співлокалізація кортактину з центросомою може бути необхідною для розгалуження актинових філаментів та здійснення центросомою актиноорганізуючої функції. Для підтвердження того, що структура з якою співлокалізується BCR є саме центросомою, ми використали антитіла до γ -тубуліну та BCR та пофарбували фіксовані клітини K562 DAPI та фалоїдином, кон'югованим з FITC, для візуалізації актину (рис. 3.15).

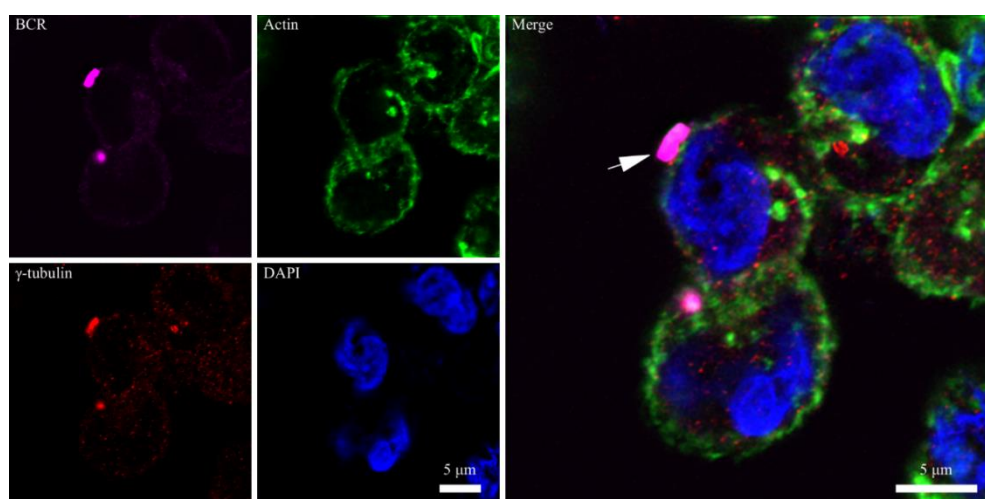


Рис. 3.15. Конфокальне зображення фіксованих клітин K562, забарвлених FITC-фалоїдином та антитілами до BCR та γ -тубуліну. Стрілкою показана співлокалізація BCR з γ -тубуліном та актином. Масштаб – 5 мкм

Нами було виявлено, що BCR співлокалізується з γ -тубуліном. В ділянці їх співлокалізації також спостерігалось концентрація актину та його розгалуження, що свідчить на користь гіпотези про участь BCR в розгалуженні актину. Коефіцієнти Мандерса для співлокалізації BCR з γ -тубуліном та актином становили $65,6 \pm 2,6\%$ та $83,2 \pm 4,1\%$. Частка співлокалізації γ -тубуліну з BCR та актином становила $49,6 \pm 2,6\%$ та $73,8 \pm 0,6\%$. Актин співлокалізується з BCR із значенням коефіцієнту Мандерса $36,6 \pm 5,8\%$, частка співлокалізації актину з γ -тубуліном становить $38,0 \pm 3,6\%$. З наших результатів випливає, що подібну функцію він може виконувати як при клатрин-опосередкованому ендоцитозі при поглинанні везикули, так і в центросомній ділянці. Подібна поліфункціональність білка BCR може пояснювати, чому його злиття з білком ABL при хромосомній транслокації між 9 та 22 хромосою, може мати такий вплив на онкогенну трансформацію кровотворних клітин. В цьому контексті цікаво було б дізнатися, чи може білок ABL самостійно співлокалізуватися з центросомою. Це дало б відповідь на те, чи має вплив актин-зв'язувальний домен білка ABL на його співлокалізацію з центром організації актину. З цією метою ми пофарбували фіксовані клітини K562 DAPI та фалоїдином, кон'югованим з FITC, а також антитілами до BCR та ABL. Такий характер імунозбарвлення дозволив би виявити чи здатен ABL за відсутності BCR частини локалізуватися в ділянці центру організації актину, що характерний для центросоми. В результаті нами було виявлено, що антитіла до ABL та до BCR співлокалізуються в ділянці розгалуження актину, розташування якої характерне для актиноорганізуючого центру (рис. 3.16). Ми встановили, що частка BCR, яка перекриває ABL та актин становить $75,9 \pm 2,3\%$ та $87,6 \pm 2,1\%$ відповідно. Відповідні значення співлокалізації між ABL та BCR, та між ABL та актином становлять $67,7 \pm 1,9\%$ та $89,3 \pm 1,4\%$. Актин співлокалізується з BCR та ABL із значеннями коефіцієнтів Мандерса $24,5 \pm 2,1\%$ та $30,7 \pm 2,4\%$. Таким чином, ми показали, що саме BCR частина залучає химерний білок BCR/ABL до центросоми за рахунок домену PH. Ми припускаємо, що за рахунок BCR частини білок ABL співлокалізується з центросомою, де може призводити до порушення її нормальної функції за рахунок конституційної тирозин-кіназної активності.

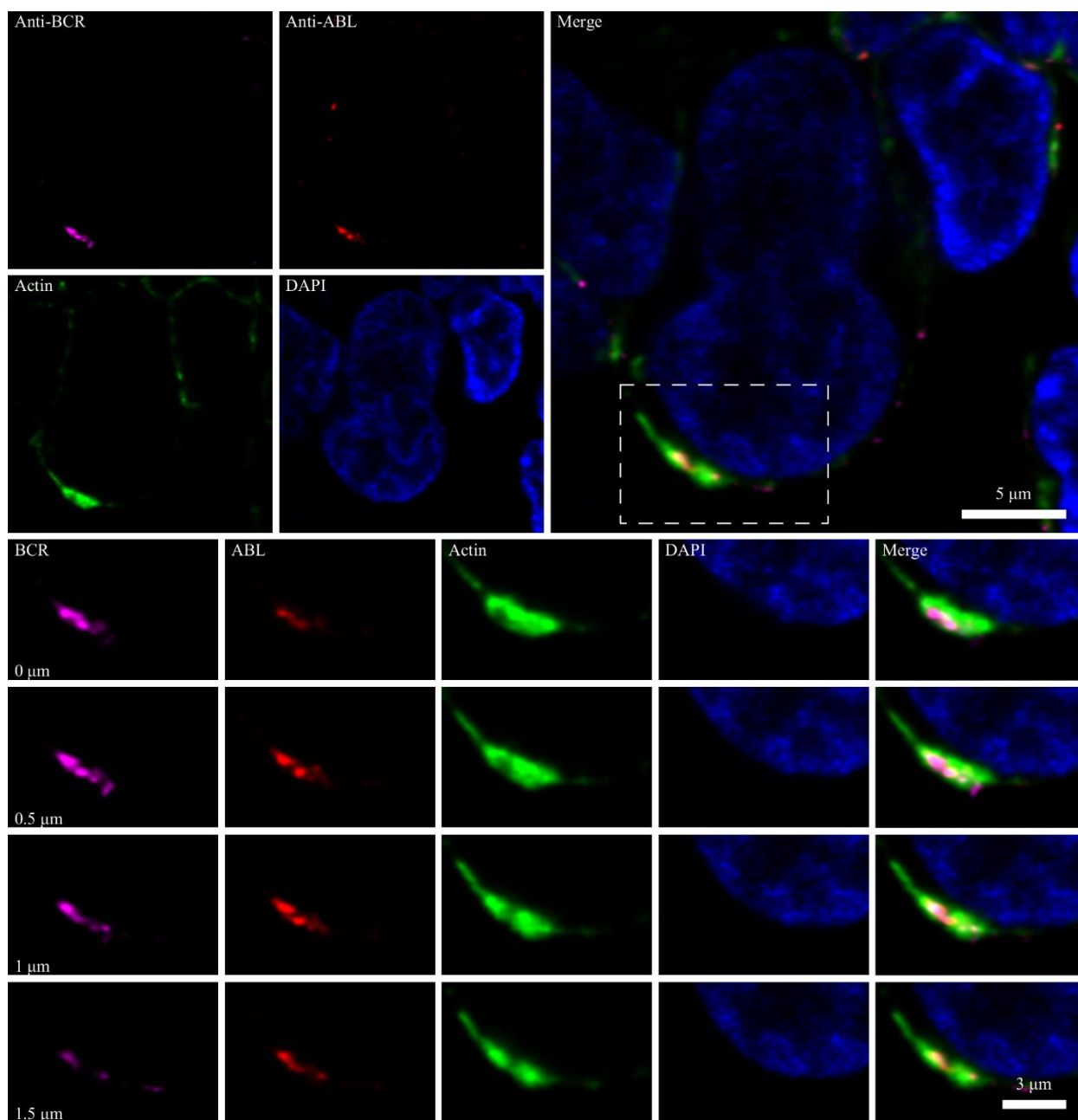


Рис. 3.16. Конфокальне зображення фіксованих клітин K562, забарвлених FITC-фалоїдином та антитілами до BCR та ABL. На збільшеному зображенні показано з-зріз навколоядерної ділянки співлокалізації BCR та ABL з розгалуженням актинових філаментів

Узагальнюючи отримані нами результати ми можемо говорити про те, що домен PH білка BCR є важливою частиною для таких функцій повнорозмірного білка як

розгалуження актинових філаментів в тандемі з кортактином, а також для його локалізації з центросомою.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковані у наступних роботах:

Gurianov D.S., Antonenko S.V., Telegeev G.D. PH domain of BCR provides colocalization of full-length BCR with centrosome together with cortactin to facilitate actin-organizing function. *Biopolymers and cell.* 2021; 37(1): 3-13

Gurianov D.S., Sadytska N.O. Telegeev G.D. Intracellular localization of BCR, actin and clathrin determined by fluorescent microscopy XIV IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists Abstract Book. – 2020, p16.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Структурні відмінності, що відрізняють BCR-ABL_{p210} та BCR-ABL_{p190} полягають в наявності або відсутності певної ділянки білка BCR, що містить домен PH та DH. Відсутність цієї ділянки у p190 асоціюється з гострою лімфобластною лейкемією, А наявність у формі p210 злитого білка призводить до хронічної мієлоїдної лейкемії, яка є мієлопроліферативним захворюванням. Таким чином ця ділянка має суттєве значення на вплив химерного білка на сигнальні шляхи, які визначають фенотип лейкемії. Попередні дослідження Д. Мірошниченко та співавторів показали, що білок p210 має в основному навколоядерну локалізацію, тоді як форма p190 – розташована рівномірно по всій клітині (6). Ми припустили, що такі відмінності локалізації викликані саме доменом PH білка BCR. Для доменів PH різних білків характерне зв'язування з ліпідами та участь у білок-білкових взаємодіях. Оскільки ліпіди є складовою багатьох органел клітини, то можна припустити, що саме домен PH відповідає за те, в яких структурах буде локалізуватися білок BCR, або ж, у випадку транслокації – химерний білок BCR-ABL. За допомогою мас-спектрометрії в попередніх дослідженнях було виявлено, що домен PH має 23 потенційних білка-партнера, з якими він може взаємодіяти в клітинах K562, що є моделлю для дослідження ХМЛ, так як ці клітини мають перебудову t(9;22) та походять від хворого на ХМЛ. Одними з таких білків партнерів є кортактин та β-тубулін. Результати мас-спектрометрії часто потребують додаткового підтвердження іншими методами, оскільки утворення білкових комплексів з мішенню може відбуватися як всередині клітини, так і після лізису. Тому в нашій роботі ми поставили за мету визначити внутрішньоклітинну локалізацію білка BCR, домену PH, а також визначити чи здатні вони співлокалізуватися з білками-партнерами кортактином, та β-тубуліном у живих та фіксованих клітинах.

Кортактин належить до білків, що контролюють реорганізацію актинового цитоскелету. Він складається з декількох доменів - кислий домен, ділянка прямих повторів, домен спіралі, пролін-збагачена ділянка та SH3 домен. Кислий домен необхідний для зв'язування кортактину з комплексом Arp2/3, за рахунок чого

відбувається розгалуження актинових філаментів. Для активації кортактин потребує фосфорилування тирозинових залишків в складі пролін-збагаченої ділянки. Оскільки химерний білок BCR-ABL має конститутивну тирозин-кіназу активність, то імовірно, що зв'язування його з кортактином може призводити до його аномальної активації та дерегуляції пов'язаних з ним сигнальних шляхів. В нашій роботі ми виявили, що в фіксованих клітинах HEK293T, трансфікованих генетичними конструкціями pmCitrine-C1-PH та pEGFP-C3-CTTN, що кортактин співлокалізується з доменом PH у навколоядерній ділянці (рис. 3.5). Виходячи з отриманих даних, можна сказати, що саме PH частина білка BCR заякорює химерний білок у навколоядерній ділянці. Співлокалізація домену PH та кортактину може бути підтвердженням гіпотези про порушення нормальної функції кортактину за рахунок його аномального фосфорилування з боку кінази ABL. Підвищена експресія кортактину призводить до підвищення інвазивності та рухливості клітин при багатьох видах раку (149). Також кортактин регулює фокальну адгезію клітин. Така регуляція здійснюється завдяки тому, що кіназа фокальної адгезії FAK (**f**ocal **a**dhesion **k**inase) зв'язується з SH3 доменом кортактину та фосфорилує його тирозинові залишки Y421 та Y466, що призводить до його активації. Відомо, що фосфорилування цих залишків корелює з наявністю метастазів при плоскоклітинній карциномі глотки (150). Іншим відомим білком, що здійснює активацію кортактину через його фосфорилування є SRC кіназа, що фосфорилує залишки тирозину Y421, Y466, та Y482 (151). В результаті адапторний білок Nck взаємодіє з кортактином та забезпечує його зв'язування з нейрональним білком WASp (N-WASp) та WASp-зв'язувальним білком WIP (**W**ASp-**i**nteracting **p**rotein) для активації Arp2/3 комплексу та активацію розгалуження актину (152).

За допомогою програми GPS 2.1 ми здійснили біоінформатичний аналіз потенційних сайтів фосфорилування кортактину для кінази ABL та порівняли їх з передбаченими сайтами для кінази SRC (рис. 3.2). Ми виявили 7 ідентичних сайтів для SRC та ABL кінази - Y384, Y396, Y409, Y416, Y427, Y433, Y449, кожен з яких знаходився в межах пролін-збагаченої ділянки кортактину. Отримані дані дозволяють припустити, що ABL частина білка BCR-ABL потенційно може активувати кортактин

за рахунок фосфорилування його тирозинових залишків в пролін-збагаченій ділянці. Така активація може мати дестабілізуючий вплив на нормальні функції, до яких залучений кортактин, та призводити до онкогенної трансформації клітин. В майбутніх дослідженнях ми плануємо експериментально перевірити здатність AVL кінази фосфорилувати кортактин.

В нормі кортактин бере участь у таких процесах як регуляція актинового цитоскелета, формування подосоми та ламелоподії, інтегринове сигналювання, формування аксонів та деградація позаклітинного матриксу. Він також є важливим компонентом для координації актинових філаментів під час поглинання везикули при клатрин-опосередкованому ендоцитозі (153). Він локалізується в примембранній ділянці і взаємодіє з динаміном, що належить до родини великих ГТФаз. Разом вони здійснюють відщеплення клатринових везикул від плазматичної мембрани, забезпечуючи при цьому розгалуження сітки актинових філаментів. Цікаво зазначити, що динамін містить у своєму складі домен РН. Окрім цього ділянка прямих повторів кортактину, яка складається з 6,5 повторів довжиною по 37 амінокислот, у третьому повторі містить домен, що зв'язується з фосфатидилінозитолфосфатами. Ми припускаємо, що в тандемі з доменом РН білка VCR, кортактин може регулювати розгалуження актину подібно до того, як це відбувається при взаємодії з динаміном. Тому наступним етапом досліджень було визначити чи бере участь білок VCR та його домен РН у реорганізації актину при клатрин-опосередкованому ендоцитозі.

Нами було виявлено, що білок VCR у фіксованих імунозбарвлених клітинах K562 співлокалізується з кортактином (рис. 3.9). На периферії клітини ці точки співлокалізації співпадають з точками розгалуження актину, що був мічений FITC-фалоїдином. Таким чином ми вперше показали, що білок VCR в тандемі з кортактином може брати участь в розгалуженні актинових філаментів. Ми виявили, що домен РН співлокалізується з кортактином у точках прикріплення клітин НЕК293Т до субстрату, що було показано нами на живих клітинах, трансфікованих конструкціями рEGFP-C3-РН та рmTagRFP-N1-CTTN (рис. 3.11). Таким чином, ми можемо стверджувати, що домен РН білка VCR може бути необхідним для заякорювання білка VCR у примембранному просторі та його участі в утворенні

фокальної адгезії. Оскільки здатність створювати розгалуження актину у тандемі з кортактином є одним з ключових процесів під час поглинання везикули при клатрин-опосередкованому ендоцитозі, то необхідно було визначити, чи здатен білок BCR аналогічно до динаміну брати участь в цьому процесі. Для цього нами було проведено трансфекцію живих клітин HEK293T генетичними конструкціями pmCherry-clathrin та pEGFP-BCR, а також пофарбовано актинові волокна барвником для живих клітин SiR-actin. В результаті нами було виявлено, що білок BCR може співлокалізуватися з окремими клатриновими везикулами. Окрім цього ми зафіксували що BCR супроводжує ділянки розгалуження актинових волокон. Варто також звернути увагу, що нами була виявлена досить велика цитоплазматична структура, в якій відбувалася динамічна співлокалізація білка BCR з клатрином (рис. 3.6). Визначення, що саме це за структура, потребує окремих маркерів субклітинних структур, однак одночасна візуалізація одразу чотирьох каналів під час отримання на конфокальному мікроскопі зображення живих клітин є проблематичним завданням, оскільки потребує одночасної детекції в чотирьох каналах різних флуорофорів, наявності лазерів необхідної довжини хвилі, а також дихроїчних дзеркал. В нашому досліді ми обмежилися трьома каналами для одночасної детекції клатрину, BCR та актину. З літературних даних відомо, що окрім структурного компонента клатринових везикул, клатрин може також знаходитися в комплексі Гольджі. На користь гіпотези, що ідентифікована нами структура є комплексом Гольджі свідчить також той факт, що одним із потенційних білків партнерів домену PH є білок GLG1 (Golgi sialoglycoprotein 1) (6). Ці дані, отримані за допомогою мас-спектрометрії, були також підтверджені за допомогою коїмунопреципітації та флуоресцентної мікроскопії (154). Білок GLG1, відомий також як MG160, має 90% гомологію з фактором росту фібробластів та лігандом E-селектину та знаходиться в медіальних цистернах комплексу Гольджі (155). Виявлена нами структура також може бути ранньою ендосоною. Рання ендосома є похідною комплексу Гольджі та є частиною ендочитарного транспортного шляху. Рання ендосома є сортувальним центром в клітині, де вирішується доля лігандів, поглинених під час клатрин-залежного та клатрин-незалежного ендоцитозу (156). Рання ендосома має дуже динамічну та

плеоморфну структуру, яка складається з тонких трубчастих видовжених ділянок діаметром близько 60 нм та великих везикулярних ділянок діаметром 400 нм (157). Ендоцитарний шлях є важливим для процесів, які визначають взаємодію клітин із навколишнім середовищем, включаючи рецепторне сигналювання, адгезію та міграцію клітин, потрапляння патогенів, обмін мембранних білків та засвоєння поживних речовин. Кілька популяцій ендоцитарних везикул доставляють вміст до ранньої ендосоми з плазматичної мембрани. Принаймні дві з них утворюються клатрин-залежним шляхом – APPL1-вмісні (158) та SNX15-вмісні (159) везикули. Везикули також надходять до ранньої ендосоми з комплексу Гольджі. З ендосоми везикули сортуються і зазнають деградації шляхом мультивезикулярних тілець, які після дозрівання зливаються з лізосоною, або ж потрапляють назад до плазматичної мембрани чи комплексу Гольджі (160,161). Відомо з літературних даних, що потрапляння клатрину до ранніх ендосом можливе за рахунок взаємодії з білком Hrs. Зв'язування Hrs з ендосоною забезпечується доменом FYVE, що взаємодіє з фосфатидил-інозитол-3-фосфатами (162). Оскільки домен PH здатен зв'язуватися з високою афінністю саме з фосфатидилінозитол-3-фосфатами, то можна припустити, що така властивість також може забезпечувати зв'язування з клатрином. Повнорозмірний білок BCR здатен взаємодіяти з білком Mint3, який локалізується в транс-мережі Гольджі та бере участь у регуляції сортування везикул (45). Також відомим партнером білка BCR, що бере участь в ендосомальному сортигу є білок TSG101 (163). Ми припускаємо, що присутність химерного білка BCR-ABL в складі ранньої ендосоми може призводити до порушення системи сигналювання та сортигу лігандів, що здійснюється ранньою ендосоною. Як наслідок, можливе порушення ключових сигнальних шляхів, що може призвести до онкотрансформації клітини. На користь цієї гіпотези також існуючі дані, що BCR-ABL в лейкоцих клітинах здатен утворювати комплекс з білками ANI-1 та динаміном-2 (DNM2) в ендосомальному компартменті, що дозволяє йому модифікувати злоякісний фенотип цих клітин за допомогою унікального механізму клітинного ендоситозу та опосередкованої активними формами кисню аутофагії (164). За допомогою мікроскопії надвисокої роздільної здатності STED ми виявили, що у фіксованих

імуномічених клітинах K562 білок BCR здатен точково співлокалізуватися з кортактином та клатрином, а також локалізуватися з актином в точці його розгалуження (рис. 3.8, 3.10). Роль актину у клатрин-опосередкованому ендоцитозі та у функціонуванні ранніх ендосом є добре вивченою. Актинові філаменти є необхідною матрицею при від'єднанні клатринової везикули від плазматичної мембрани (153). Окрім цього, актинові філаменти разом з мікротрубочками відіграють ключову роль у ендосомальному сортуванні, а також у біогенезі та дозріванні самих ендосом. Це забезпечується білками WASP та кортактином, що взаємодіють з Arp2/3 комплексом та розгалужують актинові філаменти (165–170). Актинова мережа разом з WASH регулює ендосомальний транспорт $\alpha 5$ -інтегринів. Порушення цього процесу призводить до накопичення інтегринів у внутрішньоклітинних компартментах, зменшення їх кількості у сайтах фокальної адгезії, а також зменшення кількості самих сайтів фокальної адгезії (171,172). Окрім цього, актинові філаменти також здійснюють зворотну регуляцію білків, що задіяні в їх полімеризації, – було показано, що асоційовані з ендосомами актинові волокна, необхідні для своєчасного від'єднання WASP від ендосом (173). Було також показано, що кортактин взаємодіє з фосфатидил-інозитол-3,5-біфосфатами, що входять до складу ендосом (174). Ми припускаємо, що домен PH білка BCR може за рахунок взаємодії з кортактином та фосфатидилінозитолами заякорювати кортактин на мембранах ендосом та впливати на полімеризацію актину. Нами було отримано зображення надвисокої роздільної здатності домену PH у фіксованих клітинах HEK293T (рис. 3.7). Домен PH мав вигляд кілець, діаметром приблизно 200 нм. Ми припускаємо, що така форма може бути пов'язана з взаємодією з клатриновими везикулами, які мають подібну форму. Ми зробили порівняння отриманих нами зображень надвисокої роздільної здатності домену PH з наявним в літературі зображенням клатринових везикул, отриманих за допомогою флуоресцентної мікроскопії надвисокої роздільної здатності STORM (175) та виявили структурну подібність розподілу домену PH та везикул, вкритих клатрином (рис. 4.1). Таким чином, ми припускаємо, що домен PH здатен «обліплювати» клатринові везикули, імовірно за рахунок своїх ліпід-зв'язувальних властивостей. Конфокальне

зображення клітин HEK293T, трансфікованих конструкціями pEGFP-C3-CTTN, pmCitrine-C1-PH та mCherry-clathrin, виявило потрібну співлокалізацію між доменом PH, кортактином та клатрином у ділянках біля ядра клітини (рис. 3.5). Цікавим фактом також виявилось те, що частина клатрину мала ядерну локалізацію, хоча

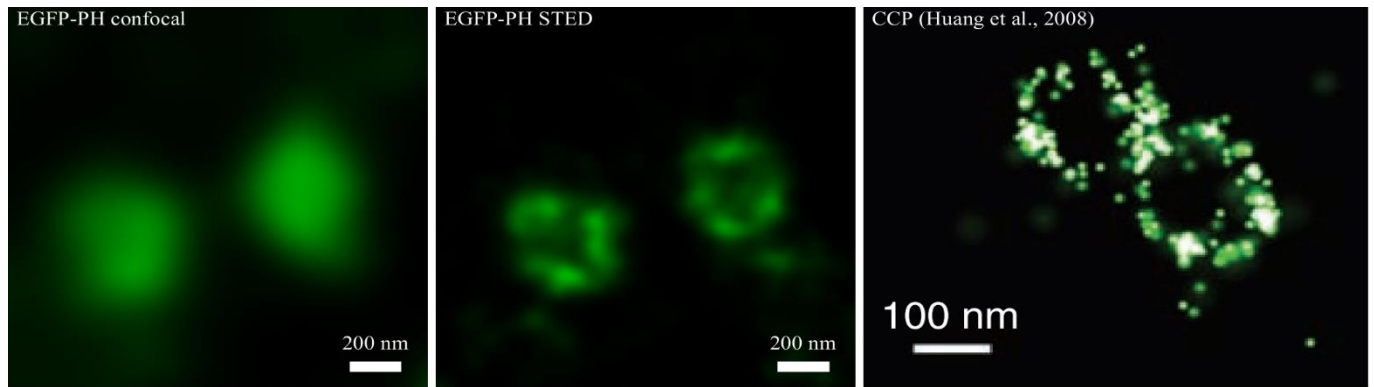


Рис. 4.1. Порівняння отриманого нами субдифракційного зображення домену PH з наявним в літературі субдифракційним зображенням везикул, вкритих клатрином. Ліворуч та по центру – отримані нами зображення домену PH. Праворуч – зображення везикул, вкритих клатрином, адаптовано до (132)

відомо, що клатрин є цитоплазматичним білком. Аналіз літературних джерел виявив, що існують дані про так звані неканонічні функції клатрину, не пов'язані з ендцитозом. У складі клатринових везикул клатрин існує у вигляді тримерів, які ще називають трискеліон. Однак існує механізм перемикання, що переводить клатрин із тримерного стану в мономерний. Після цього стає можливою його інтерналізація до ядра клітини. В ядрі мономерний клатрин здатен активувати транскрипцію білка p53 за рахунок залучення ацетилтрансферази p300 (176). Білок p53 є відомим онкосупресором та проапоптичним білком, порушення функції якого часто корелює з розвитком раку (177–181). Однак механізм, який перемикає клатрин з тримерного стану в мономерний на даний момент не досліджений. Іншою неканонічною функцією клатрину є підтримання цілісності центросом за рахунок взаємодії з комплексом TACC3–chTOG. Інактивація клатрину призводила до блокування дозрівання центросом та порушення веретена поділу (139). Клатрин також здатен регулювати міжклітинні контакти за рахунок взаємодії з кадгеринами (182).

Розгалуження актину в місцях міжклітинних контактів також визначається приступністю клатрину та білка Нір, а також фосфорилуванням тирозинових залишків 1477 та 1497 SRC кіназою (140). В свою чергу, інтерналізація та поглинання рецепторів забезпечується за рахунок дефосфорилування клатрину. Оскільки за допомогою біоінформатичного аналізу ми визначили, що ABL та SRC кінази можуть мати спільні мішені, то ми припускаємо, що клатрин може бути також мішенню химерного білка BCR/ABL. В нещодавній роботі по дослідженню фосфопротеома білків BCR/ABL_{p190} та BCR/ABL_{p210} було експериментально доведено, що 1477 тирозиновий залишок важкого ланцюга клатрину може бути фосфорильований обома формами онкобілка BCR/ABL, підтверджуючи наше припущення про здатність впливати на перебіг ендоцитарного транспорту за рахунок конститутивної тирозинкіназної активності ABL (183). Таким чином, це може бути одним із функціональних зв'язків порушення інтерналізації рецепторів та цілісності центросом у клітинах ХМЛ.

Перед нами постало завдання ідентифікувати, до якого субклітинного компартменту належить навколоядерна ділянка з якою здатні співлокалізуватися домен PH, повнорозмірний BCR, клатрин, та кортакін. В попередніх дослідженнях за допомогою мас-спектрометрії та коімунопреципітації було показано, що β -тубулін взаємодіє з доменом PH білка BCR. Він є однією з двох субодиниць, з яких складаються мікротрубочки – α - та β -тубуліну. Мікротрубочки є важливим структурним елементом клітини, вони беруть участь у клітинному поділі, а також у везикулярному транспорті (161). Мікротрубочки здатні приєднуватися до ранніх ендосом та здійснювати везикулярний транспорт за допомогою білка Rab5. Rab5 є малою ГТФазою і стимулює як асоціацію ранніх ендосом з мікротрубочками, так і рух ранніх ендосом у напрямку до мінусових кінців мікротрубочок. Більше того, рух ендосоми залежить від фосфатидилінозитол-3-кінази hVPS34. Таким чином, Rab5 функціонально пов'язує регуляцію мембранного транспорту, переміщення та внутрішньоклітинний розподіл ранніх ендосом (184). Цікаво, що домен PH білка BCR, що знаходиться поруч з доменом PH, має ГТФазну активність. Ми припустили, що BCR за рахунок зв'язування з ліпідною частиною ранніх ендосом, може також

модулювати зв'язування їх з мікротрубочками. Відомо, що за певних умов ранні ендосоми здатні накопичуватися біля ядра клітини за участі комплексу STIM1/p150Glued/динеїн (185). Після цього ранні ендосоми дозрівають за рахунок Rab7, PI3, 5P2 та лізосомально-асоційованого мембранного білка 1 (LAMP - 1) у пізні ендосоми, а потім і у лізосоми (186,187).

Для визначення місця співлокалізації між білком BCR та β -тубуліном ми трансфікували клітини HEK293T конструкціями ECFP-Bcr, mTagRFP-N1-CTTN та пофарбували прижиттєвою міткою SiR-tubulin, що зв'язується з мікротрубочками. Конфокальна флуоресцентна мікроскопія живих клітин HEK293T показала що кортактин та BCR не співлокалізуються з мікротрубочками. Однак, ми виявили, що повнорозмірний білок BCR разом з кортактином співлокалізується з перинуклеарною структурою, від якої розходить філаментарний тубулін. Ми також виявили, що домен PH також здатен співлокалізуватися з цією структурою, і також в присутності кортактину. Відомо, що полімеризація мікротрубочок регулюється центросомою, яку ще називають центром організації мікротрубочок. Центросоми складаються з двох центріолей, розташованих під прямим кутом один до одного, і оточені щільною, високоструктурованою масою білка, що називається періцентриолярним матеріалом (PCM). PCM містить білки, що відповідають за нуклеацію та закріплення мікротрубочок, включаючи γ -тубулін, періцентрин та дев'їн. Кожна центріоль центросоми являє собою дев'ять триплетів мікротрубочок, зібраних у кільцеву структуру, і містить центрин, ценексин та тектин (188,189). Таким чином, хоча центросома є регулятором полімеризації мікротрубочок, до складу її періцентриольного матеріалу входить в основному γ -тубулін, а не α - чи β -тубулін. Для з'ясування того, що собою може являти перинуклеарна структура, з якою співлокалізується домен білок BCR та кортактин ми використали антитіла до γ -тубуліну. Ми спостерігали співлокалізацію між BCR та γ -тубуліном у фіксованих клітинах K562 в перинуклеарній ділянці. Оскільки ми також спостерігали навколоядерну локалізацію клатрину, то ми припускаємо, що клатрин, кортактин, та білок BCR здатні локалізуватися в центросомній ділянці та що домен PH білка BCR є необхідним для заякорювання його до центросоми. Окрім цього, забарвлення FITC-

фалоїдином показало, що в місцях їх співлокалізації присутнє скупчення актину та його розгалуження. З літератури відомо, що окрім функції нуклеації мікротрубочок, центросома також є центром організації актину. Центросомна нуклеація актинових волокон регулюється білком WASH в тандемі з комплексом Arp2/3. Залучення цих білків до центросоми регулюється перицентріольним білком PCM1 (**P**ericentriolar **m**aterial 1) (148). Оскільки кортактин має подібну до WASH функцію розгалуження актинових філаментів при взаємодії з Arp2/3, ми вважаємо що його співлокалізація з доменом PH в центросомній ділянці може мати вплив на регуляцію полімеризації актину. Раніше було показано, що фосфорильований кортактин асоційований з центросомою (190). Оскільки фосфорилування кортактину є необхідною умовою для його активації та здійснення розгалуження актину, ми вважаємо, що білок ABL може здійснювати неконтрольоване фосфорилування кортактину в ділянці центросоми, таким чином дерегулюючи функцію організації актину центросомою. Для визначення, чи здатен білок ABL співлокалізуватися в центросомній ділянці розгалуження актину, ми обробили фіксовані клітини K562 антитілами до BCR та до ABL, а також FITC-фалоїдином та DAPI. Ми виявили співлокалізацію між ABL та BCR у навколоядерній ділянці розгалуження актину. Нами не було виявлено локалізації білка ABL в цій ділянці без BCR. Це може означати, що саме BCR частина химерного білка BCR/ABL відповідальна за закорювання ABL до центросоми, де за рахунок конститутивної тирозин-кіназної активності можуть порушуватися її нормальне функціонування. Однак на даний момент невідомо, чи залучення ABL до центросомної ділянки є результатом його злиття з BCR частиною, або ж BCR частина може залучати повнорозмірний Abl до центросоми. Порушення функції центросоми є характерною особливістю для багатьох видів раку (147). Їх можна розділити на дві групи – структурні та кількісні порушення. Структурні виникають за рахунок неконтрольованої експресії або пост-трансляційної модифікації компонентів центросоми. Внаслідок цього центросома може мати аномально великий розмір. Іншим наслідком може бути утворення центросомо-подібних тілець в нехарактерних місцях в клітині за рахунок агрегації надекспресованих або некоректно модифікованих компонентів центросоми (191). Обидва типи аберацій зустрічаються

в онкотрансформованих клітинах (192). Згідно літературних даних, центросомні аберації характерні для Ph позитивних лейкемій, що містять білок BCR/ABL_{p210}. Автори продемонстрували за допомогою коїмунопреципітації, що ABL_{p145} та BCR/ABL_{p210} асоційовані з центросомою (193). Ці результати говорять на користь гіпотези про незалежне рекрутування повнорозмірного ABL білком BCR. Іншим поясненням може бути взаємодія з центросомними білками на етапі лізису клітин, адже як було сказано вище, центросомні білки мають схильність до агрегації. Відомо також, що центросомні аберації корелюють зі стадією хвороби. Було виявлено, що приблизно 30% клітин у хронічній фазі містять центросомні порушення, в той час як на стадії бластного кризу 55% клітин містили аберації центросоми. Окрім цього, клітини на стадії бластного кризу містили більше додаткових порушень каріотипу порівняно з клітинами на хронічній стадії (6% проти 73%) (144). Таким чином прогресуючі порушення функції центросоми за рахунок залучення химерного білка BCR/ABL_{p210} можуть бути причиною поступового збільшення злоякісності лейкемічних клітин.

В клітинах HEK293T в яких ми візуалізували співлокалізацію домену PH з кортактином в центросомній ділянці ми також виявили, що в частині клітин кортактин здатен локалізуватися в ядрі (рис. 3.14), хоча зазвичай він має виключно цитоплазматичне розташування. Оскільки домен PH та повнорозмірний білок BCR здатні локалізуватися в ядрі, постало питання, чи можуть BCR та кортактин співлокалізуватися в ядрі та за яких умов. Ми виявили, що дійсно BCR та кортактин співлокалізувалися в ядрі в клітині на термінальній стадії поділу, про що свідчить наявність перетяжки між двома клітинами (рис. 3. 12). Таким чином ми показали, що співлокалізація BCR та кортактину в ядрі відбувається під час клітинного поділу. Про ядерні функції кортактину відомо мало. Є дані, що кортактин може переміщуватися в ядро клітин у відповідь на ацетилювання з боку білка Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) (141). Показано, що Keap1 взаємодіє з Nrf2, головним регулятором реакції на оксидативний стресу (194,195). Функція кортактину в ядрі клітини наразі не досліджена. Оскільки в нормі кортактин відповідає за розгалуження актинових філаментів, то можливо подібну функцію він може виконувати і в ядрі

клітини. На користь цього існування ядерних форм білків родини Arg, подібних до тих, що входять до складу комплексу Arg2/3, що зв'язується з кортактином (196,197). Є дані, що у відповідь на пошкодження ДНК, білок ABL здатен транслокуватися у ядро та індукує формування ядерного філаментарного актину (198). Цікавим є також дослідження в якому химерний білок BCR-ABL було цілеспрямовано спрямовано в ядро клітини за рахунок додавання до його ділянки сигнальної послідовності ядерної локалізації NLS (Nuclear Iocalization signal). Результатом такої маніпуляції став апоптоз клітин K562 (199). Таким чином, якщо узагальнити наші дані з літературними, як ABL, так і BCR здатні локалізуватися в ядрі. Для ABL це генотоксичний стрес, тоді як BCR може локалізуватися в ядрі і за звичайних умов. Оскільки химерний білок BCR/ABL_{p210} має цитоплазматичне розташування, можна припустити, що це визначається саме ABL частиною, що не дозволяє білку BCR виконувати свої ядерні функції. Оскільки ми зафіксували співлокалізацію BCR з кортактином у клітинах, що діляться, ми припускаємо, що ця функція може полягати у підтриманні ядерної архітектури за рахунок реорганізації ядерного актину. Подібна реорганізація може бути ключовою для функцій ядерного актину – підтримання комплексів ремоделювання хроматину, участь у транскрипції, зв'язування з рибонуклеопротейнами, репарації ДНК та організації хроматину в ядрі (142,196,197,200). Порушення цих функцій може призводити до антиапоптичного ефекту, накопичення пошкоджень ДНК та онкотрансформації клітини.

Узагальнюючи отримані нами результати ми можемо говорити про те, що домен PH білка BCR є важливою частиною для таких функцій повнорозмірного білка як розгалуження актинових філаментів в тандемі з кортактином, а також для його локалізації з центросомою. Ми також виявили співлокалізацію BCR з білком клатрин, що є структурним компонентом клатринових везикул, при чому ця співлокалізація спостерігалася як в примембранній ділянці, так і в цитоплазматичному компартменті, що за розмірами нагадує ранню ендосому, так і в навколоядерній ділянці. В подальшому ми виявили, що ця навколоядерна ділянка є центросомою. Ми не виявили співлокалізації білка BCR з мікротрубочками, про що могла свідчити його взаємодія з β -тубуліном. Однак було виявлено, що BCR співлокалізується з

центросомою, при чому домен РН є необхідним для цього, так як він здатен самостійно заякорюватися на центросомі. Центросома є сайтом нуклеації мікротрубочок, і хоча в основному складається з тубуліну типу γ , все ж імовірно невелика частина β -тубуліну може бути присутня в сайті ініціації росту мікротрубочок. Таким чином, ми припускаємо, що якщо показана раніше методом коімунопреципітації взаємодія домену РН із β -тубуліном і має місце в клітині, то відбувається це в сайті центру організації мікротрубочок. Окрім цього, центросома також є центром організації актину. Таким чином ми бачимо, що розгалуження актину у тандемі з кортактином з боку BCR відбувається по всьому ендоцитарному шляху – починаючи від поглинання везикул на цитоплазматичній мембрані, продовжуючи в ранніх ендосомах та комплексі Гольджі, і закінчуючи ретроградним транспортом ендосом до перинуклеарної центросомної ділянки. Відомо, що комплекс Гольджі та центросома працюють скоординовано в часі та просторі та регулюють нуклеацію мікротрубочок та актинових філаментів відповідно до потреб клітини та фази клітинного циклу (201). Варто зазначити, що клатрин здатен локалізуватися у всіх цих компартментах. Можна сказати, що білок BCR є важливим для здійснення мембранно-цитоскелетних перебудов, що здійснюється за рахунок ліпід-зв'язувальної функції домену РН у тандемі з актиноорганізуючою функцією кортактину та клатрину, забезпечуючи таким чином рецепторне сигналювання, ендоцитарне сортування інтерналізованих лігандів та структурну цілісність центросоми. Однак, оскільки в клітинах ХМЛ BCR злитий з білком ABL, то ми припускаємо, що ABL фосфорилує білки партнери BCR і таким чином порушує баланс та цілісність процесів, до яких залучений BCR, оскільки тирозин-кіназна активність ABL є конститутивною. Оскільки ми спостерігали співлокалізацію BCR та кортактину в ядрі на термінальній стадії поділу, коли ще наявна перетяжка між двома клітинами, а химерний білок BCR/ABL має зазвичай цитоплазматичне розташування, ми вважаємо, що за рахунок частини ABL, BCR не може потрапляти в ядро та виконувати свої нормальні функції пов'язані з підтримкою цілісності ДНК та ядерної архітектури, що можливо здійснюється за рахунок регуляції полімеризації актину. Однак підтвердження цього потребує подальших досліджень. Дерегуляція функцій

кортактину та клатрину, а також центросомні аберації корелюють з певними ознаками злякисного фенотипу клітин ХМЛ, зокрема порушення міжклітинних контактів через фосфорилування кортактину та порушення функції інтегринів може призводити до передчасного від'єднання кровотворних клітин попередників від строми кісткового мозку. Внаслідок цього вони не зможуть отримувати сигнали диференціації від мікрооточення та зазнають онкотрансформації та клональної експансії. Оскільки форма химерного білка BCR-ABL_{p210} асоційована з ХМЛ, а форма BCR-ABL_{p190} – з ГЛЛ, важливо визначити, чи виявлені нами функції домену PH BCR призводять до того, що відбувається розвиток саме ХМЛ, а не ГЛЛ. Можливо, що заякорювання до певних клітинних компартментів змінює панель мішеней які фосфорилує ABL частина, яка у складі p190 вільно розташована в цитоплазмі та може вражати більше мішеней. Іншим поясненням також може бути дерегуляція нормальної функції BCR за рахунок делеції його PH та DH доменів у складі BCR-ABL_{p190}. Існуючі підходи у терапії ХМЛ та ГЛЛ полягають у використанні інгібіторів тинозин-кіназної активності ABL. Однак такий підхід вимагає прийняття препарату протягом решти життя, окрім цього, створюється селективний тиск на лейкемічні клітини, що призводить до виникнення та експансії клітин з мутаціями в кіназному домені ABL, що призводить до стійкості та необхідності розробки нових поколінь інгібіторів тирозин-кінази ABL. Вивчені в даній роботі функціональні зв'язки BCR з кортактином, клатрином та центросомою робить можливим розробку альтернативних та політаргетних стратегій терапії Ph⁺ позитивних лейкемій, направлених на блокування зв'язування химерного білка з кортактином, клатрином та центросомою, а також можливого пошуку агентів, здатних до їх селективного дефосфорилування.

ВИСНОВКИ

Вивчено участь білка BCR та його домену PH у розвитку BCR-ABL-позитивної хронічної мієлоїдної лейкемії. У роботі встановлено співлокалізацію BCR з кортактином, клатрином та центросомним тубуліном за рахунок домену PH. Вперше показано можливість ядерної співлокалізації між білком BCR та кортактином, а також продемонстровано структурні особливості такої співлокалізації. Отримані дані суттєво доповнюють існуючі знання про сигнальні шляхи, до яких залучені BCR-ABL_{p210} та BCR-ABL_{p190}, що дозволить запропонувати альтернативні підходи до терапії хронічної мієлоїдної лейкемії

1. Створено генетичні конструкції pECFP-C3-CTTN, pmCitrine-C1-PH, pmTagRFP-N1-CTTN для еукаріотичної експресії кортактину та домену PH білка BCR для визначення їх внутрішньоклітинної локалізації за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

2. За допомогою біоінформатичного аналізу було передбачено 7 сайтів фосфорилювання кортактину у збагаченій проліном ділянці, що є спільними для SRC та ABL кінази, що передбачає можливість активації кортактину кіназою ABL.

3. Розроблено алюмінієву камеру у вигляді мікрослайду для флуоресцентної конфокальної мікроскопії живих клітин, що має перевагу над існуючими аналогами.

4. За допомогою конфокальної та субдифракційної флуоресцентної мікроскопії STED клітин K562 та HEK293T виявлено, що білок BCR та домен PH білка BCR співлокалізується з кортактином, клатрином, та з точками розгалуження актину в різних компартментах клітини – примембранній ділянці, цитоплазмі та навколядерній ділянці, що свідчить про його можливу участь у забезпеченні системи ендосомального сортиру та фокальній адгезії клітин.

5. Виявлено співлокалізацію білка BCR з кортактином у ядрі клітини на термінальній стадії поділу, при якій кортактин та BCR формують структуру, в якій кортактин знаходиться в центрі, а BCR формує навколо нього оболонку.

6. Виявлено, що VCR частина білка VCR-ABL за рахунок домену PH співлокалізується з кортактином та γ -тубуліном у центросомній ділянці в місцях розгалуження актину.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. NOWELL PC. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut* [Internet]. 1962 Apr [cited 2021 Mar 22];8(2):65–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14480647/>
2. Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science* [Internet]. 1986 Jul 11;233(4760):212–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3460176>
3. Chen Y, Peng C, Sullivan C, Li D, Li S. Critical molecular pathways in cancer stem cells of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* [Internet]. 2010 Sep;24(9):1545–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20574455>
4. Li S, Ilaria RL, Million RP, Daley GQ, Van Etten RA. The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *J Exp Med*. 1999 May;189(9):1399–412.
5. Reckel S, Gehin C, Tardivon D, Georgeon S, Kükenshöner T, Löhr F, et al. Structural and functional dissection of the DH and PH domains of oncogenic Bcr-Abl tyrosine kinase. *Nat Commun*. 2017;8(1):2101.
6. Miroshnychenko D, Dubrovskaya A, Maliuta S, Telegeev G, Aspenström P. Novel role of pleckstrin homology domain of the Bcr-Abl protein: analysis of protein-protein and protein-lipid interactions. *Exp Cell Res* [Internet]. 2010 Feb 15;316(4):530–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19944685>
7. Buday L, Downward J. Roles of cortactin in tumor pathogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Jun;1775(2):263–73.
8. Clark ES, Whigham AS, Yarbrough WG, Weaver AM. Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res*. 2007;67:4227–35.
9. Kirkbride KC, Hong NH, French CL, Clark ES, Jerome WG, Weaver AM. Regulation of late endosomal/lysosomal maturation and trafficking by cortactin affects Golgi

- morphology. *Cytoskeleton*. 2012;69:625–43.
10. Kirkbride KC, Sung BH, Sinha S, Weaver AM. Cortactin. *Cell Adh Migr* [Internet]. 2011 Mar 28;5(2):187–98. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cam.5.2.14773>
 11. Daubon T, Rochelle T, Bourmeyster N, Génot E, G??not E. Invadopodia and rolling-type motility are specific features of highly invasive p190bcr-abl leukemic cells. *Eur J Cell Biol*. 2012;91:978–87.
 12. Jeannot P, Besson A. Cortactin function in invadopodia. *Small GTPases* [Internet]. 2020 Jul 3 [cited 2021 Mar 17];11(4):256–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29172953/>
 13. MacGrath SM, Koleske AJ. Cortactin in cell migration and cancer at a glance. *J Cell Sci* [Internet]. 2012 Apr 1;125(Pt 7):1621–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22566665>
 14. Castellanos-Martínez R, Jiménez-Camacho KE, Schnoor M. Cortactin Expression in Hematopoietic Cells. *Am J Pathol* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2021 Mar 17];190(5):958–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32084363/>
 15. Parker AL, Kavallaris M, McCarroll JA. Microtubules and Their Role in Cellular Stress in Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2014 Jun 18;4. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2014.00153/abstract>
 16. Hall A. The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2009 Jun 21 [cited 2021 Mar 12];28(1–2):5–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19153674/>
 17. Li X, Wang J. Mechanical tumor microenvironment and transduction: cytoskeleton mediates cancer cell invasion and metastasis. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2020 Apr 27 [cited 2021 Mar 17];16(12):2014–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32549750/>
 18. Fernandes MS, Reddy MM, Gonneville JR, DeRoo SC, Podar K, Griffin JD, et al. BCR-ABL promotes the frequency of mutagenic single-strand annealing DNA repair. *Blood*. 2009 Aug;114(9):1813–9.
 19. Dierov J, Dierova R, Carroll M. BCR/ABL translocates to the nucleus and disrupts an

- ATR-dependent intra-S phase checkpoint. *Cancer Cell* [Internet]. 2004 Mar [cited 2020 Dec 24];5(3):275–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15050919/>
20. Jørgensen HG, Holyoake TL. Characterization of cancer stem cells in chronic myeloid leukaemia. *Biochem Soc Trans*. 2007 Nov;35(5):1347–51.
 21. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* [Internet]. 1973 Jun 1;243(5405):290–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4126434>
 22. Perrotti D, Jamieson C, Goldman J, Skorski T. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *J Clin Invest* [Internet]. 2010 Jul;120(7):2254–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20592475>
 23. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1–positive chronic myeloid leukemia. *Blood* [Internet]. 2009 Feb 19;113(8):1619–30. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/113/8/1619/26037/Molecular-biology-of-bcrabl1positive-chronic>
 24. Advani AS, Pendergast AM. Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects. *Leuk Res*. 2002 Aug;26(8):713–20.
 25. Zhao X, Ghaffari S, Lodish H, Malashkevich VN, Kim PS. Structure of the Bcr-Abl oncoprotein oligomerization domain. *Nat Struct Biol* [Internet]. 2002 Feb;9(2):117–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11780146>
 26. Piwocka K, Vejda S, Cotter TG, O’Sullivan GC, McKenna SL. Bcr-Abl reduces endoplasmic reticulum releasable calcium levels by a Bcl-2-independent mechanism and inhibits calcium-dependent apoptotic signaling. *Blood*. 2006 May;107(10):4003–10.
 27. Carella AM, Daley GQ, Eaves CJ, Goldman JM, Rudiger H, editors. *Chronic Myeloid Leukemia*. CRC Press; 2001. 3–41 p.
 28. Marega M, Piazza RG, Pirola A, Redaelli S, Mogavero A, Iacobucci I, et al. BCR and BCR-ABL regulation during myeloid differentiation in healthy donors and in chronic phase/blast crisis CML patients. *Leukemia* [Internet]. 2010 Aug;24(8):1445–9.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20520635>

29. Collins S, Coleman H, Groudine M. Expression of bcr and bcr-abl fusion transcripts in normal and leukemic cells. *Mol Cell Biol*. 1987 Aug;7(8):2870–6.
30. Park A-R, Oh D, Lim S-H, Choi J, Moon J, Yu D-Y, et al. Regulation of dendritic arborization by BCR Rac1 GTPase-activating protein, a substrate of PTPRT. *J Cell Sci*. 2012 Oct;125(Pt 19):4518–31.
31. Perazzona B, Lin H, Sun T, Wang Y, Arlinghaus R. Kinase domain mutants of Bcr enhance Bcr-Abl oncogenic effects. *Oncogene*. 2008 Apr;27(15):2208–14.
32. Deribe YL, Pawson T, Dikic I. Post-translational modifications in signal integration. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Jun;17(6):666–72.
33. Olsen J V., Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, et al. Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell*. 2006 Nov;127(3):635–48.
34. Filippakopoulos P, Müller S, Knapp S. SH2 domains: modulators of nonreceptor tyrosine kinase activity. *Curr Opin Struct Biol* [Internet]. 2009 Dec;19(6):643–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19926274>
35. Nagar B, Hantschel O, Seeliger M, Davies JM, Weis WI, Superti-Furga G, et al. Organization of the SH3-SH2 unit in active and inactive forms of the c-Abl tyrosine kinase. *Mol Cell* [Internet]. 2006 Mar 17;21(6):787–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16543148>
36. Chang Y-C, Tien S-C, Tien H-F, Zhang H, Bokoch GM, Chang Z-F. p210(Bcr-Abl) desensitizes Cdc42 GTPase signaling for SDF-1alpha-directed migration in chronic myeloid leukemia cells. *Oncogene* [Internet]. 2009 Nov 19;28(46):4105–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19718053>
37. Rojas RJ, Yohe ME, Gershbarg S, Kawano T, Kozasa T, Sondek J. Galphaq directly activates p63RhoGEF and Trio via a conserved extension of the Dbl homology-associated pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Oct 5;282(40):29201–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17606614>
38. Puil L, Liu J, Gish G, Mbamalu G, Bowtell D, Pelicci PG, et al. Bcr-Abl oncoproteins

- bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J.* 1994 Feb;13(4):764–73.
39. Li S, Couvillon AD, Brasher BB, Van Etten RA. Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling. *EMBO J.* 2001 Dec;20(23):6793–804.
 40. Kweon S-M, Cho YJ, Minoo P, Groffen J, Heisterkamp N. Activity of the Bcr GTPase-activating domain is regulated through direct protein/protein interaction with the Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Feb 8;283(6):3023–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18070886>
 41. Hoffmann D. *Modular Protein Domains*. Edited by Giovanni Cesareni, Mario Gimona, Marius Sudol, and Michael Yaffe. *ChemBioChem*. 2005 Apr;6(4):761–2.
 42. Yan J, Wen W, Xu W, Long J-F, Adams ME, Froehner SC, et al. Structure of the split PH domain and distinct lipid-binding properties of the PH-PDZ supramodule of alpha-syntrophin. *EMBO J.* 2005;24:3985–95.
 43. Dowler S, Currie RA, Campbell DG, Deak M, Kular G, Downes CP, et al. Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities. *Biochem J* [Internet]. 2000 Oct 1;351(Pt 1):19–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11001876>
 44. Hirata M, Kanematsu T, Takeuchi H, Yagisawa H. Pleckstrin Homology Domain as an Inositol Compound Binding Module. *Jpn J Pharmacol* [Internet]. 1998;76(3):255–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021519819312028>
 45. Malmberg EK. Bcr (breakpoint cluster region) protein binds to PDZ-domains of scaffold protein PDZK1 and vesicle coat protein Mint3. *J Cell Sci.* 2004 Nov;117(23):5535–41.
 46. Voncken JW, van Schaick H, Kaartinen V, Deemer K, Coates T, Landing B, et al. Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. *Cell* [Internet]. 1995 Mar 10;80(5):719–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7889565>
 47. Greuber EK, Smith-Pearson P, Wang J, Pendergast AM. Role of ABL family kinases in cancer: from leukaemia to solid tumours. *Nat Rev Cancer.* 2013 Aug;13(8):559–71.
 48. Plattner R, Kadlec L, DeMali KA, Kazlauskas A, Pendergast AM. c-Abl is activated

by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. *Genes Dev.* 1999 Sep;13(18):2400–11.

49. Khatri A, Wang J, Pendergast AM. Multifunctional Abl kinases in health and disease. *J Cell Sci.* 2016 Jan;129(1):9–16.
50. Koleske AJ. Abl Family Kinases in Development and Disease. *Abl Family Kinases in Development and Disease.* New York, NY: Springer New York; 2006.
51. Zandy NL, Playford M, Pendergast AM. Abl tyrosine kinases regulate cell-cell adhesion through Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Nov 6;104(45):17686–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965237>
52. Shaul Y. c-Abl: activation and nuclear targets. *Cell Death Differ.* 2000 Jan;7(1):10–6.
53. Demehri S, O’Hare T, Eide CA, Smith CA, Tyner JW, Druker BJ, et al. The function of the pleckstrin homology domain in BCR–ABL-mediated leukemogenesis. *Leukemia* [Internet]. 2010 Jan 17;24(1):226–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/leu2009196>
54. Lemmon MA, Ferguson KM. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* [Internet]. 2000 Aug 15;350(1):1. Available from: <http://www.biochemj.org/bj/350/bj3500001.htm>
55. Klein F, Feldhahn N, Harder L, Wang H, Wartenberg M, Hofmann W-K, et al. The BCR-ABL1 kinase bypasses selection for the expression of a pre-B cell receptor in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med* [Internet]. 2004 Mar 1;199(5):673–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14993251>
56. Klein F, Feldhahn N, Müschen M. Interference of BCR-ABL1 Kinase Activity with Antigen Receptor Signaling in B cell Precursor Leukemia Cells. *Cell Cycle* [Internet]. 2004 Jul 28;3(7):856–8. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.3.7.991>
57. Voncken JW, van Schaick H, Kaartinen V, Deemer K, Coates T, Landing B, et al. Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. *Cell.* 1995;80:719–28.
58. Ling X, Ma G, Sun T, Liu J, Arlinghaus RB. Bcr and Abl interaction: oncogenic activation of c-Abl by sequestering Bcr. *Cancer Res* [Internet]. 2003 Jan

- 15;63(2):298–303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12543778>
59. Dixon AS, Lim CS. The nuclear translocation assay for intracellular protein-protein interactions and its application to the Bcr coiled-coil domain. *Biotechniques* [Internet]. 2010 Jul;49(1):519–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20615205>
60. Zheng X, Oancea C, Henschler R, Moore MAS, Ruthardt M. Reciprocal t(9;22) ABL/BCR fusion proteins: leukemogenic potential and effects on B cell commitment. *PLoS One*. 2009 Oct;4(10):e7661.
61. Buchner J, Kiefhaber T. *Protein Folding Handbook*. Buchner J, Kiefhaber T, editors. Protein Folding Handbook. Wiley; 2005.
62. Haslam RJ, Koide HB, Hemmings BA. Pleckstrin domain homology. *Nature* [Internet]. 1993 May 27;363(6427):309–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8497315>
63. Thomas CC, Dowler S, Deak M, Alessi DR, van Aalten DM. Crystal structure of the phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate-binding pleckstrin homology (PH) domain of tandem PH-domain-containing protein 1 (TAPP1): molecular basis of lipid specificity. *Biochem J*. 2001 Sep;358(Pt 2):287–94.
64. Lemmon MA, Ferguson KM. Molecular determinants in pleckstrin homology domains that allow specific recognition of phosphoinositides. *Biochem Soc Trans*. 2001 Aug;29(4):377–84.
65. Lenoir M, Kufareva I, Abagyan R, Overduin M. *Membrane and Protein Interactions of the Pleckstrin Homology Domain Superfamily*. Membranes (Basel). 2015 Oct;5(4):646–63.
66. Lemmon MA. Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. *Biochem Soc Trans*. 2004;32:707–11.
67. Lemmon MA, Ferguson KM, Abrams CS. Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS Lett* [Internet]. 2002 Feb 20;513(1):71–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793%2801%2903243-4>
68. Bartolini F, Gundersen GG. Formins and microtubules. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2010 Feb;1803(2):164–73.

69. Martín-Cófreces NB, Alarcón B, Sánchez-Madrid F. Tubulin and Actin Interplay at the T Cell and Antigen-Presenting Cell Interface. *Front Immunol* [Internet]. 2011;2. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2011.00024/abstract>
70. Teixeira CA, Miranda CO, Sousa VF, Santos TE, Malheiro AR, Solomon M, et al. Early axonal loss accompanied by impaired endocytosis, abnormal axonal transport, and decreased microtubule stability occur in the model of Krabbe's disease. *Neurobiol Dis.* 2014 Jun;66:92–103.
71. Gundersen GG, Cook TA. Microtubules and signal transduction. Vol. 11, *Current Opinion in Cell Biology*. 1999. p. 81–94.
72. Yeh I-T, Ludueña RF. The betaII isotype of tubulin is present in the cell nuclei of a variety of cancers. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2004 Feb;57(2):96–106.
73. Ammer AG, Weed SA. Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. *Cell Motil Cytoskeleton* [Internet]. 2008 Sep;65(9):687–707. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18615630>
74. GUNST SJ. Actions by actin: reciprocal regulation of cortactin activity by tyrosine kinases and F-actin. *Biochem J.* 2004 May;380(1):e7–8.
75. Kelley LC, Hayes KE, Gatesman Ammer A, Martin KH, Weed SA. Revisiting the ERK/Src cortactin switch. *Commun Integr Biol* [Internet]. 2011 Mar 27;4(2):205–7. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cib.4.2.14420>
76. Weed SA, Parsons JT. Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene.* 2001 Oct;20(44):6418–34.
77. Tsujita K, Suetsugu S, Sasaki N, Furutani M, Oikawa T, Takenawa T. Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J Cell Biol.* 2006 Jan;172(2):269–79.
78. Ren G, Helwani FM, Verma S, McLachlan RW, Weed SA, Yap AS. Cortactin Is a Functional Target of E-cadherin-activated Src Family Kinases in MCF7 Epithelial Monolayers. *J Biol Chem.* 2009 Jul;284(28):18913–22.
79. Wu H, Parsons JT. Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous

- actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J Cell Biol.* 1993 Mar;120(6):1417–26.
80. Itoh T, Erdmann KS, Roux A, Habermann B, Werner H, De Camilli P. Dynamins and the Actin Cytoskeleton Cooperatively Regulate Plasma Membrane Invagination by BAR and F-BAR Proteins. *Dev Cell* [Internet]. 2005 Dec;9(6):791–804. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580705004284>
81. Clark ES, Weaver AM. A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion. *Eur J Cell Biol* [Internet]. 2008 Sep;87(8–9):581–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18342393>
82. Takano K, Toyooka K, Suetsugu S. EFC/F-BAR proteins and the N-WASP–WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization. *EMBO J.* 2008 Nov;27(21):2817–28.
83. van Rossum AGSH, Schuurin-Scholtes E, van Buuren-van Seggelen V, Kluin PM, Schuurin E. Comparative genome analysis of cortactin and HS1: the significance of the F-actin binding repeat domain. *BMC Genomics* [Internet]. 2005 Feb 14;6:15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15710041>
84. Martelli AM, Nyåkern M, Tabellini G, Bortul R, Tazzari PL, Evangelisti C, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia* [Internet]. 2006 Jun;20(6):911–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16642045>
85. Thomas CC, Deak M, Alessi DR, van Aalten DM. High-Resolution Structure of the Pleckstrin Homology Domain of Protein Kinase B/Akt Bound to Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphate. *Curr Biol* [Internet]. 2002 Jul;12(14):1256–62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982202009727>
86. Tibes R, Kornblau SM, Qiu Y, Mousses SM, Robbins C, Moses T, et al. PI3K/AKT pathway activation in acute myeloid leukaemias is not associated with AKT1 pleckstrin homology domain mutation. *Br J Haematol* [Internet]. 2008 Feb;140(3):344–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.2007.06920.x>
87. Gattazzo C, Martini V, Frezzato F, Trimarco V, Tibaldi E, Castelli M, et al. Cortactin,

another player in the Lyn signaling pathway, is over-expressed and alternatively spliced in leukemic cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2014 Jun;99(6):1069–77.

88. Martini V, Gattazzo C, Frezzato F, Trimarco V, Pizzi M, Chiodin G, et al. Cortactin, a Lyn substrate, is a checkpoint molecule at the intersection of BCR and CXCR4 signalling pathway in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2021 Mar 20];178(1):81–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28419476/>
89. Passaro D, Irigoyen M, Catherinet C, Gachet S, Da Costa De Jesus C, Lasgi C, et al. CXCR4 Is Required for Leukemia-Initiating Cell Activity in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* [Internet]. 2015 Jun 8;27(6):769–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26058076>
90. Schnoor M, Stradal TE, Rottner K. Cortactin: Cell Functions of A Multifaceted Actin-Binding Protein. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2018 Feb;28(2):79–98. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892417302003>
91. Robinson MS. Forty Years of Clathrin-coated Vesicles. *Traffic*. 2015 Dec;16(12):1210–38.
92. Kirchhausen T, Owen D, Harrison SC. Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2014 May 1;6(5):a016725. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24789820>
93. Brodsky FM. Diversity of Clathrin Function: New Tricks for an Old Protein. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2012 Nov 10;28(1):309–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22831640>
94. Twyman RM. Clathrin and Clathrin-Adaptors. In: *Encyclopedia of Neuroscience* [Internet]. Elsevier; 2009. p. 1013–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080450469013644>
95. Moshkanbaryans L, Chan L-S, Graham M. The Biochemical Properties and Functions of CALM and AP180 in Clathrin Mediated Endocytosis. *Membranes* (Basel) [Internet]. 2014 Jul 31;4(3):388–413. Available from:

0375/4/3/388

96. van der Geer P. Analysis of Protein–Protein Interactions by Coimmunoprecipitation. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press Inc.; 2014 [cited 2021 Mar 20]. p. 35–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24674061/>
97. Einarson MB, Pugacheva EN, Orlinick JR. GST Pull-down. *Cold Spring Harb Protoc* [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2021 Mar 20];2007(8):pdb.prot4757-pdb.prot4757. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21357137/>
98. Louche A, Salcedo SP, Bigot S. Protein–protein interactions: Pull-down assays. In: *Methods in Molecular Biology* [Internet]. Humana Press Inc.; 2017 [cited 2021 Mar 20]. p. 247–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28667618/>
99. Tan Y, Tian T, Liu W, Zhu Z, J Yang C. Advance in phage display technology for bioanalysis. *Biotechnol J* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2021 Mar 20];11(6):732–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27061133/>
100. Algar WR, Hildebrandt N, Vogel SS, Medintz IL. FRET as a biomolecular research tool — understanding its potential while avoiding pitfalls. *Nat Methods* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2021 Mar 20];16(9):815–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31471616/>
101. Weibrecht I, Leuchowius K-J, Clausson C-M, Conze T, Jarvius M, Howell WM, et al. Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. *Expert Rev Proteomics* [Internet]. 2010 Jun 1 [cited 2021 Mar 20];7(3):401–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20536310/>
102. Wang P, Yang Y, Hong T, Zhu G. Proximity ligation assay: an ultrasensitive method for protein quantification and its applications in pathogen detection. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2021 Feb 11 [cited 2021 Mar 20];105(3):923–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33427935/>
103. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W, Prasher D. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* (80-) [Internet]. 1994 Feb 11 [cited 2021 Mar 21];263(5148):802–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8303295/>
104. Fradkov AF, Chen Y, Ding L, Barsova E V., Matz M V., Lukyanov SA. Novel fluorescent protein from *Discosoma* coral and its mutants possesses a unique far-red

- fluorescence. *FEBS Lett* [Internet]. 2000 Aug 18 [cited 2021 Mar 21];479(3):127–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10981720/>
105. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2019 [cited 2021 Mar 21];1897:299–311. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30539454/>
106. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2014 Apr [cited 2021 Mar 21];32(4):347–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24584096/>
107. Cox G, Sheppard CJR. Practical limits of resolution in confocal and non-linear microscopy. *Microsc Res Tech* [Internet]. 2004 Jan 1 [cited 2021 Mar 21];63(1):18–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14677129/>
108. Erni R, Rossell MD, Kisielowski C, Dahmen U. Atomic-Resolution Imaging with a Sub-50-pm Electron Probe. *Phys Rev Lett* [Internet]. 2009 Mar 2 [cited 2021 Mar 21];102(9):096101. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19392535/>
109. Schermelleh L, Ferrand A, Huser T, Eggeling C, Sauer M, Biehlmaier O, et al. Super-resolution microscopy demystified. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2021 Mar 21];21(1):72–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30602772/>
110. Xu J, Ma H, Liu Y. Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM). *Curr Protoc Cytom* [Internet]. 2017 Jul 5 [cited 2021 Mar 21];81(1):12.46.1-12.46.27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28678417/>
111. Bianchini P, Peres C, Oneto M, Galiani S, Vicidomini G, Diaspro A. STED nanoscopy: a glimpse into the future. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2021 Mar 21];360(1):143–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25743695/>
112. Khan I, Steeg PS. Endocytosis: a pivotal pathway for regulating metastasis. *Br J Cancer* [Internet]. 2021 Jan 5 [cited 2021 Mar 20];124(1):66–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33262521/>
113. Schreck C, Istvánffy R, Ziegenhain C, Sippenauer T, Ruf F, Henkel L, et al. Niche WNT5A regulates the actin cytoskeleton during regeneration of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* [Internet]. 2017 [cited 2021 Mar 20];214(1):165–81. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27998927/>

114. Tremblay CS, Brown FC, Collett M, Saw J, Chiu SK, Sonderegger SE, et al. Loss-of-function mutations of Dynamin 2 promote T-ALL by enhancing IL-7 signalling. *Leukemia* [Internet]. 2016 Oct 27 [cited 2021 Mar 20];30(10):1993–2001. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27118408/>
115. Reis CR, Chen P, Srinivasan S, Aguet F, Mettlen M, Schmid SL. Crosstalk between Akt/ $\text{GSK}3\beta$ signaling and dynamin-1 regulates clathrin-mediated endocytosis. *EMBO J* [Internet]. 2015 Aug 13 [cited 2021 Mar 20];34(16):2132–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26139537/>
116. Suzuki M, Tanaka H, Tanimura A, Tanabe K, Oe N, Rai S, et al. The Clathrin Assembly Protein PICALM Is Required for Erythroid Maturation and Transferrin Internalization in Mice. Kume T, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Feb 21 [cited 2021 Mar 20];7(2):e31854. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22363754/>
117. Nayak RC, Chang K-H, Vaitinadin N-S, Cancelas JA. Rho GTPases control specific cytoskeleton-dependent functions of hematopoietic stem cells. *Immunol Rev* [Internet]. 2013 Nov [cited 2021 Mar 20];256(1):255–68. Available from: </pmc/articles/PMC3830525/>
118. Velázquez-Avila M, Balandrán JC, Ramírez-Ramírez D, Velázquez-Avila M, Sandoval A, Felipe-López A, et al. High cortactin expression in B-cell acute lymphoblastic leukemia is associated with increased transendothelial migration and bone marrow relapse. *Leukemia* [Internet]. 2019 Jun 20 [cited 2021 Mar 20];33(6):1337–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30573781/>
119. Charles Dumontet, Jean-Pierre Jaffrezou, Etsuko Tsuchiya, George E Duran, Kevin Gang Chen, W Brent Derry, Leslie Wilson, Mary Ann Jordan BIS. Resistance to microtubule-targeted cytotoxins in a K562 leukemia cell variant associated with altered tubulin expression and polymerization - PubMed. *Bull Cancer* [Internet]. 2004 [cited 2021 Mar 20];95(5):81–112. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15568225/>
120. Delaval B, Lelièvre H, Birnbaum D. Myeloproliferative disorders: the centrosome connection. *Leukemia* [Internet]. 2005 Oct 18 [cited 2021 Mar 20];19(10):1739–44.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16107884/>

121. Lee JY, Hong W-J, Majeti R, Stearns T. Centrosome-kinase fusions promote oncogenic signaling and disrupt centrosome function in myeloproliferative neoplasms. Prigent C, editor. PLoS One [Internet]. 2014 Mar 21 [cited 2021 Mar 20];9(3):e92641. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24658090/>
122. Griesbeck O, Baird GS, Campbell RE, Zacharias DA, Tsien RY. Reducing the Environmental Sensitivity of Yellow Fluorescent Protein. J Biol Chem [Internet]. 2001 Aug 3 [cited 2021 Jan 8];276(31):29188–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11387331/>
123. Merzlyak EM, Goedhart J, Shcherbo D, Bulina ME, Shcheglov AS, Fradkov AF, et al. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. Nat Methods [Internet]. 2007 Jul 17 [cited 2021 Jan 8];4(7):555–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17572680/>
124. Cho YJ, Cunnick JM, Yi S-J, Kaartinen V, Groffen J, Heisterkamp N. Abr and Bcr, Two Homologous Rac GTPase-Activating Proteins, Control Multiple Cellular Functions of Murine Macrophages. Mol Cell Biol [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2020 May 14];27(3):899–911. Available from: <https://mcb.asm.org/content/27/3/899>
125. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res [Internet]. 1979 Nov 24;7(6):1513–23. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/7/6/1513/2380972>
126. Lezin G, Kosaka Y, Yost HJ, Kuehn MR, Brunelli L. A one-step miniprep for the isolation of plasmid DNA and lambda phage particles. PLoS One. 2011;6:e23457.
127. Sauer M-L, Kollars B, Geraets R, Sutton F. Sequential CaCl₂, polyethylene glycol precipitation for RNase-free plasmid DNA isolation. Anal Biochem [Internet]. 2008 Sep;380(2):310–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269708003667>
128. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open source platform for biological image analysis. Nat Methods. 2012;9(7):676–82.
129. Bolte S, Cordelières FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light

- microscopy. *J Microsc* [Internet]. 2006 Dec;224(Pt 3):213–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210054>
130. Manders EMM, Verbeek FJ, Aten JA. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc* [Internet]. 1993 Mar;169(3):375–82. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313.x>
131. Sage D, Donati L, Soulez F, Fortun D, Schmit G, Seitz A, et al. DeconvolutionLab2: An open-source software for deconvolution microscopy. *Methods* [Internet]. 2017 Feb;115:28–41. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202316305096>
132. Dey N, Blanc-Feraud L, Zimmer C, Roux P, Kam Z, Olivo-Marin J-C, et al. Richardson-Lucy algorithm with total variation regularization for 3D confocal microscope deconvolution. *Microsc Res Tech* [Internet]. 2006 Apr;69(4):260–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16586486>
133. KIRSHNER H, AGUET F, SAGE D, UNSER M. 3-D PSF fitting for fluorescence microscopy: implementation and localization application. *J Microsc* [Internet]. 2013 Jan;249(1):13–25. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2818.2012.03675.x>
134. Steen W. Principles of Optics M. Born and E. Wolf, 7th (expanded) edition, Cambridge University Press, Cambridge, 1999, 952pp. 37.50/US \$59.95, ISBN 0-521-64222-1. *Opt Laser Technol* [Internet]. 2000 Jul;32(5):385. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003039920000061X>
135. Aigouy B, Mirouse V. ScientiFig: a tool to build publication-ready scientific figures. *Nat Methods* [Internet]. 2013 Nov;10(11):1048. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24173380>
136. McDonald JH, Dunn KW. Statistical tests for measures of colocalization in biological microscopy. *J Microsc* [Internet]. 2013 Dec;252(3):295–302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24117417>
137. Oser M, Mader CC, Gil-Henn H, Magalhaes M, Bravo-Cordero JJ, Koleske AJ, et al. Specific tyrosine phosphorylation sites on cortactin regulate Nck1-dependent actin polymerization in invadopodia. *J Cell Sci*. 2010;123:3662–73.

138. Brodsky FM, Sosa RT, Ybe JA, O'Halloran TJ. Unconventional Functions for Clathrin, ESCRTs, and Other Endocytic Regulators in the Cytoskeleton, Cell Cycle, Nucleus, and Beyond: Links to Human Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2021 Jan 21];6(9):a017004–a017004. Available from: <http://cshperspectives.cshlp.org/>
139. Foraker AB, Camus SM, Evans TM, Majeed SR, Chen C-Y, Taner SB, et al. Clathrin promotes centrosome integrity in early mitosis through stabilization of centrosomal ch-TOG. *J Cell Biol*. 2012 Aug;198(4):591–605.
140. Bonazzi M, Vasudevan L, Mallet A, Sachse M, Sartori A, Prevost M-C, et al. Clathrin phosphorylation is required for actin recruitment at sites of bacterial adhesion and internalization. *J Cell Biol*. 2011 Oct;195(3):525–36.
141. Ito A, Shimazu T, Maeda S, Shah AA, Tsunoda T, Iemura S-I, et al. The subcellular localization and activity of cortactin is regulated by acetylation and interaction with Keap1. *Sci Signal* [Internet]. 2015 Nov 24 [cited 2020 Dec 24];8(404):ra120–ra120. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26602019/>
142. Falahzadeh K, Banaei-Esfahani A, Shahhoseini M. The potential roles of actin in the nucleus. *Cell J* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2020 Dec 24];17(1):7–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25870830/>
143. Conduit PT, Wainman A, Raff JW. Centrosome function and assembly in animal cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2015 Oct 25 [cited 2020 Aug 19];16(10):611–24. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrm4062>
144. Giehl M, Fabarius A, Frank O, Hochhaus A, Hafner M, Hehlmann R, et al. Centrosome aberrations in chronic myeloid leukemia correlate with stage of disease and chromosomal instability. *Leukemia* [Internet]. 2005 [cited 2020 Aug 19];19(7):1192–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15858613/>
145. Feit H, Slusarek L, Shelanski ML. Heterogeneity of tubulin subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1971 [cited 2021 Jan 18];68(9):2028–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5289362/>
146. Raynaud-Messina B, Merdes A. γ -tubulin complexes and microtubule organization [Internet]. Vol. 19, *Current Opinion in Cell Biology*. *Curr Opin Cell Biol*; 2007 [cited

- 2021 Jan 18]. p. 24–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17178454/>
147. Nigg EA. Origins and consequences of centrosome aberrations in human cancers. *Int J Cancer* [Internet]. 2006 Dec 15 [cited 2020 Aug 19];119(12):2717–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17016823/>
 148. Farina F, Gaillard J, Guérin C, Couté Y, Sillibourne J, Blanchoin L, et al. The centrosome is an actin-organizing centre. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2020 Aug 14];18(1):65–75. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncb3285>
 149. Patel AS, Schechter GL, Wasilenko WJ, Somers KD. Overexpression of EMS1/cortactin in NIH3T3 fibroblasts causes increased cell motility and invasion in vitro. *Oncogene* [Internet]. 1998 Jun 1 [cited 2021 Jan 23];16(25):3227–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9681820/>
 150. Marioni G, Lionello M, Marchese-Ragona R, Fasanaro E, Valentini E, Zanoletti E, et al. Cortactin and phosphorylated cortactin tyr 421 and tyr 466 expression in supraglottic laryngeal carcinomas and lymph node metastases. *Int J Biol Markers* [Internet]. 2018 Jan 9;33(1):79–86. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.5301/ijbm.5000297>
 151. Huang C, Liu J, Haudenschild CC, Zhan X. The Role of Tyrosine Phosphorylation of Cortactin in the Locomotion of Endothelial Cells. *J Biol Chem* [Internet]. 1998 Oct;273(40):25770–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819598866>
 152. Tehrani S, Tomasevic N, Weed S, Sakowicz R, Cooper JA. Src phosphorylation of cortactin enhances actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Jul 17 [cited 2021 Jan 23];104(29):11933–8. Available from: www.pnas.org/cgi/content/full/
 153. Cao H, Orth JD, Chen J, Weller SG, Heuser JE, McNiven MA. Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis. *Mol Cell Biol*. 2003;23:2162–70.
 154. Antonenko S V., Kravchuk I V., Telegeev GD. Interaction of Bcl-Abl Oncoprotein with the Glg1 Protein in K562 Cells: its Role in the Pathogenesis of Chronic Myeloid Leukemia. *Cytol Genet* [Internet]. 2020 Jan 10;54(1):48–54. Available from: <http://link.springer.com/10.3103/S0095452720010028>

155. MOURELATOS Z, GONATAS JO, CINATO E, GONATAS NK. Cloning and Sequence Analysis of the Human MG160, a Fibroblast Growth Factor and E-Selectin Binding Membrane Sialoglycoprotein of the Golgi Apparatus. *DNA Cell Biol* [Internet]. 1996 Dec [cited 2021 Jan 23];15(12):1121–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8985126/>
156. Jovic M, Sharma M, Rahajeng J, Caplan S. The early endosome: A busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol* [Internet]. 2010 Jan [cited 2021 Jan 24];25(1):99–112. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19924646>
157. Gruenberg J. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Oct;2(10):721–30.
158. Miaczynska M, Christoforidis S, Giner A, Shevchenko A, Uttenweiler-Joseph S, Habermann B, et al. APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell*. 2004 Feb;116(3):445–56.
159. Danson C, Brown E, Hemmings OJ, McGough IJ, Yarwood S, Heesom KJ, et al. SNX15 links clathrin endocytosis to the PtdIns3P early endosome independently of the APPL1 endosome. *J Cell Sci*. 2013 Nov;126(Pt 21):4885–99.
160. Burd C, Cullen PJ. Retromer: A Master Conductor of Endosome Sorting. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Feb;6(2):a016774–a016774.
161. Granger E, McNee G, Allan V, Woodman P. The role of the cytoskeleton and molecular motors in endosomal dynamics. *Semin Cell Dev Biol*. 2014 Jul;31:20–9.
162. Raiborg C, Bache KG, Mehlum A, Stang E, Stenmark H. Hrs recruits clathrin to early endosomes. *EMBO J* [Internet]. 2001 Sep 3;20(17):5008–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11532964>
163. Olabisi OO, Mahon GM, Kostenko E V., Liu Z, Ozer HL, Whitehead IP. Bcr Interacts with Components of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport-I and Is Required for Epidermal Growth Factor Receptor Turnover. *Cancer Res*. 2006 Jun;66(12):6250–7.
164. Liu X, Rothe K, Yen R, Fruhstorfer C, Maetzig T, Chen M, et al. A novel AHI-1–BCR-ABL–DNM2 complex regulates leukemic properties of primitive CML cells through enhanced cellular endocytosis and ROS-mediated autophagy. *Leukemia*. 2017

Nov;31(11):2376–87.

165. Taunton J, Rowning BA, Coughlin ML, Wu M, Moon RT, Mitchison TJ, et al. Actin-dependent propulsion of endosomes and lysosomes by recruitment of N-WASP. *J Cell Biol* [Internet]. 2000 Feb 7;148(3):519–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10662777>
166. Morel E, Parton RG, Gruenberg J. Annexin A2-Dependent Polymerization of Actin Mediates Endosome Biogenesis. *Dev Cell* [Internet]. 2009 Mar;16(3):445–57. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580709000355>
167. Tanabe K, Ohashi E, Henmi Y, Takei K. Receptor sorting and actin dynamics at early endosomes. *Commun Integr Biol* [Internet]. 2011 Nov 28;4(6):742–4. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cib.17628>
168. Muriel O, Tomas A, Scott CC, Gruenberg J. Moesin and cortactin control actin-dependent multivesicular endosome biogenesis. Blanchoin L, editor. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2016 Nov;27(21):3305–16. Available from: <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.E15-12-0853>
169. Engqvist-Goldstein ÅEY, Drubin DG. Actin Assembly and Endocytosis: From Yeast to Mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2003 Nov;19(1):287–332. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.19.111401.093127>
170. Ohashi E, Tanabe K, Henmi Y, Mesaki K, Kobayashi Y, Takei K. Receptor sorting within endosomal trafficking pathway is facilitated by dynamic actin filaments. *PLoS One* [Internet]. 2011;6(5):e19942. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21625493>
171. Duleh SN, Welch MD. Regulation of integrin trafficking, cell adhesion, and cell migration by WASH and the Arp2/3 complex. *Cytoskeleton*. 2012 Dec;69(12):1047–58.
172. Zech T, Calaminus SDJ, Caswell P, Spence HJ, Carnell M, Insall RH, et al. The Arp2/3 activator WASH regulates $\alpha 5\beta 1$ -integrin-mediated invasive migration. *J Cell Sci*. 2011 Nov;124(Pt 22):3753–9.
173. Derivery E, Helfer E, Henriot V, Gautreau A. Actin polymerization controls the organization of WASH domains at the surface of endosomes. Keen J, editor. *PLoS*

- One. 2012 Jun;7(6):e39774.
174. Hong NH, Qi A, Weaver AM. PI(3,5)P2 controls endosomal branched actin dynamics by regulating cortactin–actin interactions. *J Cell Biol.* 2015 Aug;210(5):753–69.
 175. Huang B, Wang W, Bates M, Zhuang X. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science.* 2008 Feb;319(5864):810–3.
 176. Ohmori K, Endo Y, Yoshida Y, Ohata H, Taya Y, Enari M. Monomeric but not trimeric clathrin heavy chain regulates p53-mediated transcription. *Oncogene.* 2008 Apr;27(15):2215–27.
 177. Muller PAJ, Vousden KH. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol.* 2013 Jan;15(1):2–8.
 178. Muller PAJ, Vousden KH. Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. *Cancer Cell* [Internet]. 2014 Mar;25(3):304–17. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610814000373>
 179. Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2014 May 17;14(5):359–70. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrc3711>
 180. Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2002;4(2):70–6.
 181. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Apr;8(4):275–83.
 182. Bonazzi M, Kühbacher A, Toledo-Arana A, Mallet A, Vasudevan L, Pizarro-Cerdá J, et al. A Common Clathrin-Mediated Machinery Co-ordinates Cell-Cell Adhesion and Bacterial Internalization. *Traffic.* 2012 Dec;13(12):1653–66.
 183. Reckel S, Hamelin R, Georgeon S, Armand F, Jolliet Q, Chiappe D, et al. Differential signaling networks of Bcr-Abl p210 and p190 kinases in leukemia cells defined by functional proteomics. *Leukemia* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2021 Mar 22];31(7):1502–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28111465/>
 184. Nielsen E, Severin F, Backer JM, Hyman AA, Zerial M. Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat Cell Biol.* 1999 Oct;1(6):376–82.
 185. Villari G, Enrico Bena C, Del Giudice M, Gioelli N, Sandri C, Camillo C, et al.

- Distinct retrograde microtubule motor sets drive early and late endosome transport. *EMBO J* [Internet]. 2020 Dec 15 [cited 2021 Jan 24];39(24). Available from: <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/embj.2019103661>
186. Galvez T, Gilleron J, Zerial M, O'Sullivan GA. SnapShot: Mammalian Rab proteins in endocytic trafficking. *Cell*. 2012 Sep;151(1):234-234.e2.
187. Wandinger-Ness A, Zerial M. Rab Proteins and the Compartmentalization of the Endosomal System. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2014 Nov 1;6(11):a022616–a022616. Available from: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a022616>
188. Lawo S, Hasegan M, Gupta GD, Pelletier L. Subdiffraction imaging of centrosomes reveals higher-order organizational features of pericentriolar material. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2012 Nov 21;14(11):1148–58. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncb2591>
189. Rieder CL, Faruki S, Khodjakov A. The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2001 Oct;11(10):413–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567874>
190. Wang W, Chen L, Ding Y, Jin J, Liao K. Centrosome separation driven by actin-microfilaments during mitosis is mediated by centrosome-associated tyrosine-phosphorylated cortactin. *J Cell Sci* [Internet]. 2008 Apr 15 [cited 2020 Aug 14];121(8):1334–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18388321/>
191. Casenghi M, Meraldi P, Weinhart U, Duncan PI, Körner R, Nigg EA. Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation. *Dev Cell*. 2003 Jul;5(1):113–25.
192. Lingle WL, Barrett SL, Negron VC, D'Assoro AB, Boeneman K, Liu W, et al. Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb;99(4):1978–83.
193. Patel H, Gordon MY. Abnormal centrosome-centriole cycle in chronic myeloid leukaemia? *Br J Haematol* [Internet]. 2009 Aug [cited 2020 Aug 19];146(4):408–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19563513/>
194. Wang X-J, Sun Z, Chen W, Li Y, Villeneuve NF, Zhang DD. Activation of Nrf2 by

- arsenite and monomethylarsonous acid is independent of Keap1-C151: enhanced Keap1-Cul3 interaction. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2008 Aug 1;230(3):383–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18417180>
195. Shibata T, Ohta T, Tong KI, Kokubu A, Odogawa R, Tsuta K, et al. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2008 Sep 9 [cited 2021 Jan 25];105(36):13568–73. Available from: [/pmc/articles/PMC2533230/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18417180/)
196. Oma Y, Harata M. Actin-related proteins localized in the nucleus: from discovery to novel roles in nuclear organization. *Nucleus* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2020 Dec 24];2(1):38–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21647298/>
197. Blessing CA, Ugrinova GT, Goodson H V. Actin and ARPs: action in the nucleus. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2004 Aug [cited 2020 Dec 24];14(8):435–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15308210/>
198. Aoyama K, Yuki R, Horiike Y, Kubota S, Yamaguchi N, Morii M, et al. Formation of long and winding nuclear F-actin bundles by nuclear c-Abl tyrosine kinase. *Exp Cell Res* [Internet]. 2013 Dec 10 [cited 2020 Dec 24];319(20):3251–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24041959/>
199. Dixon AS, Kakar M, Schneider KMH, Constance JE, Paullin BC, Lim CS. Controlling subcellular localization to alter function: Sending oncogenic Bcr–Abl to the nucleus causes apoptosis. *J Control Release* [Internet]. 2009 Dec 16 [cited 2020 Dec 24];140(3):245–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19576252/>
200. Johnson MA, Sharma M, Mok MTS, Henderson BR. Stimulation of in vivo nuclear transport dynamics of actin and its co-factors IQGAP1 and Rac1 in response to DNA replication stress. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2013 Oct [cited 2020 Dec 24];1833(10):2334–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23770048/>
201. Rios RM. The centrosome–Golgi apparatus nexus. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* [Internet]. 2014 Sep 5;369(1650):20130462. Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2013.0462>

ДОДАТОК А

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Gurianov D.S.**, Antonenko S.V., Telegeev G.D. PH domain of BCR provides colocalization of full-length BCR with centrosome together with cortactin to facilitate actin-organizing function. *Biopolymers and cell.* 2021; 37(1): 3-13.

2. **Gurianov D.S.**, Antonenko S.V., Telegeev G.D Colocalization of BCR protein with clathrin, actin, and cortactin suggests its possible role in the regulation of actin branching and clathrin-mediated endocytosis. *Cytology and Genetics* 2021; 55(2): 152-161.

3. **Gurianov D.S.**, Antonenko S.V., Telegeev G.D Nuclear localization of BCR and cortactin indicates their potential role in regulation of actin branching in nucleus. *Experimental Oncology* 2021; 43(1): 73-76.

4. Антоненко С, **Гур'янов Д**, Кравчук І, Телегєєв Г. Аналіз клітинної локалізації PH домена Bcr-Abl з білком USP1 та розробка програми для оцінки їх сайтів фосфорилування. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2018; 22: 90-95.

5. Антоненко С, Кравчук І, **Гур'янов Д**, Телегєєв Г. Білки партнери PH домену протеїна Bcr-Abl: створення генетичних конструкцій для виявлення молекулярних особливостей розвитку ХМЛ. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017; 20: 47-52.

6. **Gurianov D**, Antonenko S, Telegeev G Colocalization of cortactin and PH domain of BCR in HEK293T cells and its potential role in cell signaling *Biopolymers and cell.* – 2016; 32(1): 26-33.

7. **Гур'янов Д**, Лисецька Т, Кравчук І, Антоненко С, Телегєєв Г.Д. Роль домену PH білка BCR у клітинних процесах, що визначають фенотип Ph'-позитивних мієлопроліферативних захворювань. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2014; 15: 44-48.

8. Лисецька Т.Ю., Кравчук І.В., Гур'янов Д.С., Телегеев Г.Д., Дибков М.В. Білки, що взаємодіють з PH доменом BCR-ABL, та їхня роль у формуванні пухлинного фенотипу при розвитку мієлопроліферативних захворювань. Досягнення і проблеми генетики, селекції і біотехнології, ЛОГОС, 2012; 3: 390-394.

9. **Gurianov D.S.**, Sadytska N.O. Telegeev G.D. Intracellular localization of BCR, actin and clathrin determined by fluorescent microscopy XIV IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists Abstract Book. 2020, p 16.

10. **D. Gurianov**, S. Antonenko, G. Telegeev Creating genetic constructs for determining spatio-temporal distribution of cortactin and the PH domain of BCR in mammalian cells *Exp Oncol* 2018, 40 (2): 159-160.

11. **Gurianov D.**, Telegeev G. Super-resolution imaging of intracellular distribution of PH domain of BCR in HEK293T cells BASEL LIFE 2018. Abstract Book. - P64.

12. **Gurianov D**, Antonenko S, Telegeev G. Possible role of PH domain of Bcr in molecular pathways that determine the phenotype of myeloproliferative disorder in Bcr-Abl positive leukemias. LIMSC – 10th Leiden International (Bio) Medical Student Conference Abstract book; 2017, p 84.

13. Antonenko S, **Gurianov D**, Kravchuk I, Telegeev G. Role of USP1, CORTACTIN and HSP27 proteins in molecular mechanisms that affect CML development. International Scientific Conference Normal and cancer stem cells: discovery, diagnosis and therapy; 2017 October 5–6, Kyiv, Ukraine.

14. **Gurianov D**, Antonenko S, Kravchuk I, Telegeev G. Colocalization analysis shows that PH domain of BCR may play role in proteasomal degradation and clathrin-mediated endocytosis through proteins CTTN and USP1, but unlikely to influence cell adhesion. 41th FEBS congress; 2016 September 3-8, Kuşadası, Turkey.

15. Антоненко С, **Гурянов Д**, Кравчук І, Телегеев Г. Колокалізація USP1 і CTTN із PH доменом онкобілка та їх роль у розвитку ХМЛ. XIII з'їзд онкологів та радіобіологів України; 2016 травень 26-28, Київ, Україна. 189-190

16. **Gurianov, D. S.**, Antonenko, S. V., Telegeev, G. D. Colocalization analysis shows the role of PH domain of BCR in proteasomal degradation and clathrin-mediated endocytosis *Acta Biochimica Polonica*, 2016; 63: 60

17. **Gurianov D. S.**, Antonenko S. V., Kravchuk I.V., Telegeev G. D. Cellular localization of b-tubulin, cortactin and PH domain of BCR, and their potential role in signalling pathways and clathrin-mediated endocytosis 12th International Congress of Cell Biology Abstract Book. 2016; 154

18. **Gurianov D.S.**, Kravchuk I.V., Maliuta O.V., Dybkov M.V., Telegeev G.D. Role of PH domain of BCR/ABL fusion protein in cytoskeleton remodeling *Biopolymers and Cell*, 2013; 29 Special Issue: 6

19. Тютюнникова А.П., Лисецька Т.Ю., **Гур'янов Д.С.**, Кравчук І.В., Телегеев Г.Д. Структурно-функціональні особливості химерних білків BCR/ABL і їх роль в патогенезі PH-позитивних лейкозів *Актуальні питання гематології та трансфузіології*, АТІКА, 2011; 143-144.