

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

ГУР'ЯНОВ ДМИТРО СЕРГІЙОВИЧ



УДК 577.2.575

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

03.00.03 — молекулярна біологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис.

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

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

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

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

Захист відбудеться 28 квітня о 10³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 В Інституті молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного 150.

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

Автореферат розіслано “ ” березня 2021 року.

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



І.В.Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Хромосомні транслокації призводять до комплексних порушень функції клітини, в тому числі і до онкогенної трансформації. Вперше визначити причинно-наслідковий зв'язок між хворобою та специфічним порушенням вдалось на прикладі Філадельфійської хромосоми, що є наслідком реципрокної транслокації між довгими плечима 9 та 22 хромосоми (David A Hungerford, 1960). Наслідком цієї транслокації є злиття генів *bcr* та *abl* (Ben-Neriah *et al.*, 1986).

Експресія злитого гена *bcr/abl* результує в утворення химерного білка BCR/ABL, що призводить до онкогенної трансформації гемопоетичної клітини (Chen *et al.*, 2010). 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*₁₉₀ – з гострою лімфоїдною лейкемією, *bcr/abl*_{p210} – з хронічною мієлоїдною лейкемією, *bcr/abl*_{p230} – з хронічною нейтрофільною лейкемією (Li *et al.*, 1999). Продукти цих генів відрізняються наявністю чи відсутністю певних функціональних доменів білка BCR. Так, в складі BCR/ABL_{p210} містяться PH, DN домени, що відсутні в складі BCR/ABL_{p190} (Miroshnychenko *et al.*, 2010; Reckel *et al.*, 2017). 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 (Buday *et al.*, 2007; Clark *et al.*, 2007; Kirkbride *et al.*, 2012). Проте при розвитку неопластичних новоутворень кортактин сприяє збільшенню агресивності пухлини, що проявляється в активному метастазуванні у віддалені осередки пухлинного процесу (Kirkbride *et al.*, 2011; Daubon *et al.*, 2012). Агресивність пухлини зростає за рахунок формування інвадоподій – актин-збагачених мембранних виростів, які характеризуються високою адгезивністю та здатні руйнувати позаклітинний матрикс завдяки синтезу матриксних металопротеаз (Jeannot *et al.*, 2020). Високу концентрацію кортактину було зафіксовано при карциномі молочної залози, меланомі, гліобластомі, колоректальному раку та інших видах онкологічних захворювань (MacGrath and Koleske, 2012). Окрім цього, підвищена експресія кортактину корелює з підвищенням рівня хемотаксису та резистентністю ряду онкогематологічних захворювань до терапії, що є підставою для несприятливого прогнозу (Castellanos-Martínez, *et al.*, 2020)

Білок β -тубулін є компонентом мікротрубочок, залучених у процеси клітинної міграції, внутрішньоклітинного транспорту та регуляції мітотичних поділів. При злякській 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 злякисного захворювання, низькою виживаністю пацієнтів та стійкістю до хіміотерапевтичних препаратів (Parker *et al.*, 2014).

Наразі існування взаємозв'язку між патогенезом онкологічних захворювань і регуляторами цитоскелетних перебудов не викликає сумнівів (Hall, 2009; Li *et al.*, 2020). Точні механізми такого зв'язку потребують детальнішого вивчення, особливо, беручи до уваги те, що вони можуть варіюватися для кожного різновиду онкологічного захворювання. Вивчення можливості залучення онкобілка BCR/ABL за рахунок домену PH у процесі везикулярного транспорту та реорганізацію цитоскелета, які регулюються кортактином та тубуліном, можуть мати ключове значення для з'ясування механізмів онкогенної трансформації гемопоетичних клітин, оскільки порушення цих процесів часто зустрічається при онкологічних захворюваннях. 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 і завдання досліджень. 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 цитоскелета 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 імунозabarвлення 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, та ін.

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 центросомній 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 ендоцитоз 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 імунозabarвлення 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 Телегееву 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 (Basel, Switzerland, 2018), 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень.

Антитіла та барвники, використані в роботі. 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), анти-клатрин-НС (Abclonal, A7886), анти-BCR (Abclonal, AA0068), кон'юговані Alexa-594 антимишачі (Thermo Scientific, R37121), кон'юговані STAR-RED антикролячі (Abberior, Німеччина), антимишачі кон'юговані Alexa-555 (Abclonal, AS057), анти-кролячі кон'юговані Alexa-647 (Abclonal, AS060), ATTO647N-фалоїдин (Sigma-Aldrich, 65906), FITC-фалоїдин (Sigma-Aldrich, P5282), DAPI (Sigma -Aldrich, D9542), SiR-актин (Spirochrome, SC001), SiR-тубулін (Spirochrome, SC002).

Ферменти, використані в роботі. Термостабільна високоточна ДНК полімераза Pfu (Fermentas, Литва), Т4 ДНК лігаза (Fermentas, Литва), термолабільна лужна фосфатаза FastAP (Fermentas, Литва), Т4 полінуклеотидкіназа (Fermentas, Литва),

ендонуклеази рестрикції EcoRV, EcoRI, BamHI, Sall, HindIII, BglII (Fermentas, Литва).

Плазмідні конструкції, використані в роботі. Вектор pET32a-PH було створено Д. Мірошниченко (ІМБіГ, Україна), 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). Вектори mCitrineC1 та pmTagRFP-N1 були люб'язно надані М. Девідсоном (Каліфорнійський університет, США). Вектор pECFP-Vcr був люб'язно наданий John Groffen та Nora Heisterkamp (плазмідна Addgene # 36415; <http://n2t.net/addgene:36415>; RRID:Addgene_36415).

Клітинні лінії E. coli, використані в роботі. Штам клітин E. coli NEB Turbo (C2984I, New England Biolabs, США) 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]*.

Клітинні лінії ссавців, використані в роботі. У роботі було використано клітинні лінії K562 та HEK293T, отримані з банку клітинних ліній ЕМБЛ, Гейдельберг, Німеччина, які були культивовані згідно з рекомендаціями Американської колекції типових культур (ATCC).

Створення плазмідних конструкцій. Кодуючу послідовність кортактину ампліфікували за допомогою пар праймерів CTTN-F (5'-tatagaattcAGATGTGGAAAGCTTCAGCAG) та CTTN-R (5'-tataggatccAAAGAAGGCCTGATCTGTAGTG), і CTTN-N-F (5'-ATGTGGAAAGCTTCAGCAGG) та CTTN-N-R (5'-AGCTCCACATAGTTGGCTGG). Продукт ампліфікації за допомогою праймерів CTTN-F та CTTN-R клонували у вектор pBluescriptSKII(+) по сайту EcoRV та субклонували у вектор pECFP-C3 по сайтам EcoRI-BamHI. Продукт ампліфікації за допомогою праймерів CTTN-N-F та CTTN-N-R клонували у вектор pBluescriptSKII(+) по сайту EcoRV та субклонували у вектор pmTagRFP-N1 по сайтам Sall-BamHI. Послідовність домену PH білка VCR вирізали з вектора pET32a-PH по сайтам BamHI-HindIII та лігували у вектор pmCitrine-C1 по сайтам BglII-HindIII. Послідовність конструкцій визначали за допомогою секвенування за методом Сенгера на автоматичному секвенаторі «Applied Biosystems 3130» (США).

Розробка камери для мікроскопії живих клітин. Дизайн мікрослайдів для мікроскопії живих клітин здійснювався у програмі FreeCAD. Фрезерування виконувалося на ЧПК станку під замовлення. Анодування алюмінію здійснювалося в 10 % H₂SO₄ при +4°C та 15 В постійного струму протягом години.

Трансфекція клітин ссавців. Трансфекція клітин HEK293T здійснювалася за допомогою поліетиленіміну (Sigma-Aldrich, США), трансфекція клітин K562 здійснювалася за допомогою Turbofect (Fermentas, Литва), за рекомендаціями виробника.

Біоінформатичний аналіз потенційних сайтів фосфорилування. Для аналізу використовували амінокислотну послідовність кортактину (NP_612632.1) взяту з бази даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації США (www.ncbi.nlm.nih.gov). Біоінформатичний аналіз потенційних сайтів фосфорилування послідовності кортактину з боку кіназ SRC та ABL проводили за допомогою програмного забезпечення GPS 2.1 (<http://gps.biocuckoo.org>).

Дослідження внутрішньоклітинної локалізації білків. Клітини HEK293T вирощували на стерильних покривних скельцях протягом 24 год перед трансфекцією чи фарбуванням. Клітини K562 вирощували в культуральних матрацах, фіксацію та імунозбарвлення виконували в 1,5 мл пробірках, та переносили на стерильні покривні скельця безпосередньо перед полімеризацією препарату. Фіксація клітин здійснювалася у 4% розчині параформальдегіду в фосфатно-сольовому буфері протягом 20 хвилин при кімнатній температурі. Пермеабілізацію клітин здійснювали у 0,1 % розчині Triton X-100 протягом 20 хвилин при кімнатній температурі. Блокування неспецифічного зв'язування антитіл здійснювали за допомогою 1% розчину бичачого сироваткового альбуміну. Після цього клітин інкубували з первинними антитілами у відповідному розведенні протягом ночі при + 4 °C. Після промивки від первинних антитіл, клітини інкубували із вторинними антитілами, міченими флуоресцентними мітками, у відповідному розведенні протягом 1 години при кімнатній температурі. Фарбування ядер здійснювали за допомогою DAPI (Sigma-Aldrich, США), фарбування актину у фіксованих клітинах здійснювали за допомогою FITC- та ATTO647-N-кон'югованого фалоїдину (Sigma-Aldrich, США). Препарат на скельцях полімеризували за допомогою середовища Mowiol 4-88 з додаванням DABCO для пригнічення вигорання флуорофорів (Sigma-Aldrich, США). Для прижиттєвої флуоресцентної мікроскопії клітини наносили на стерильні покривні скельця за 24 години до візуалізації. Перед візуалізацією покривні скельця з клітинами поміщали у алюмінієву камеру, додавали поживне середовище без фенолового червоного та герметизували камеру харчовою силіконовою змазкою. Для збарвлення актину та тубуліну в живих клітинах використовували барвники SiR-actin та SiR-тубулін відповідно (Spirochrome, Швейцарія). Препарати аналізували за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа Carl Zeiss LSM 510 Meta або Leica SP8 STED 3D. Зображення надвисокої роздільної здатності методом стимульованого виснаження випромінювання (Stimulated emission depletion – STED) отримували за допомогою мікроскопа Leica SP8 STED 3D.

Обробка зображень та кількісний аналіз співлокалізації білків. Аналіз та обробка зображень здійснювались за допомогою програмного забезпечення Fiji. Аналіз співлокалізації проводився в плагіні JaCOP з використанням коефіцієнтів Мандерса, представлених у вигляді відсотків. Перед аналізом до зображення було застосовано Гауссовий фільтр розмиття радіусом 1 піксель. Деконволюцію зображень проводили за допомогою плагіну Deconvolution Lab 2 з використанням алгоритму RLTV та теоретичної функції розсіювання точки, отриманої в плагіні PSF Generator методом Born & Wolf. Остаточний монтаж зображень здійснювали у плагіні EzFig.

Статистична обробка даних. Статистичну обробку даних співлокалізації проводили за допомогою мови програмування R в інтегрованому середовищі розробки RStudio з використанням t-критерію Стьюдента. 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.

Результати досліджень та їх обговорення

Створення генетичних конструкцій для еукаріотичної експресії. Нами було створено генетичні конструкції рECFP-C3-CTTN (для експресії повнорозмірного кортактину злитого з білком ECFP (enhanced cyan fluorescent protein) на його С-кінці), рmTagRFP-N1-CTTN (для експресії кортактину злитого з білком mTagRFP (monomeric red fluorescent protein) на його N-кінці), рmCitrine-C1-PH (для експресії домену PH білка BCR злитого з білком mCitrine (модифікація білка EYFP – enhanced yellow fluorescent protein, з підвищеною яскравістю флюоресценції) на його С-кінці) (рис. 1). Отримані генетичні конструкції були використані нами для трансфекції клітин ссавців

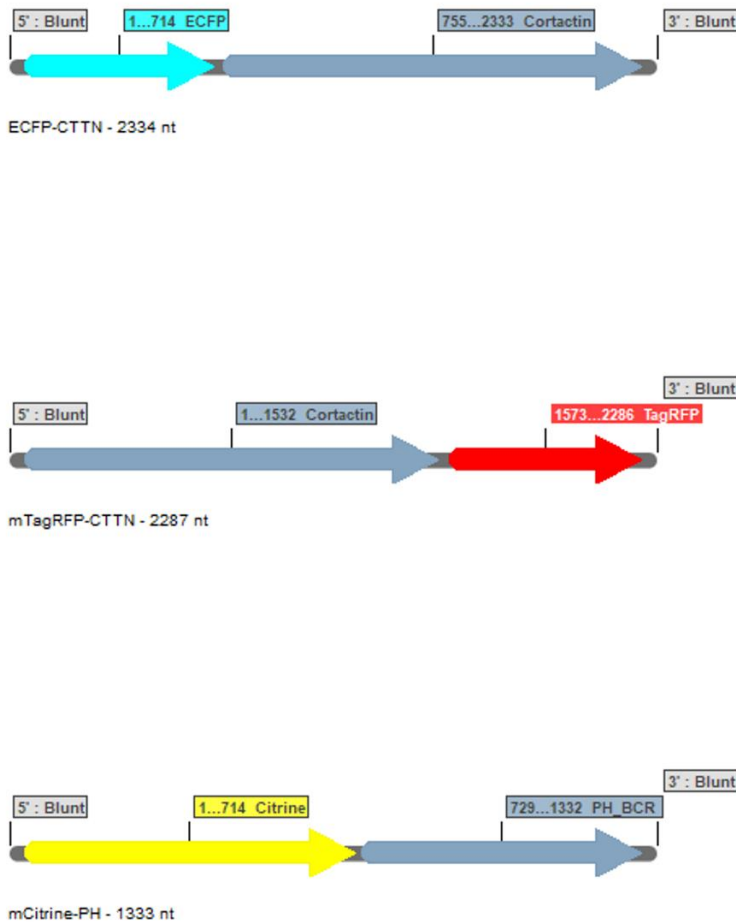


Рис. 1. Схематичне зображення нуклеотидних послідовностей кортактину та домену PH білка BCR, злитих з послідовностями флуоресцентних білків ECFP, mCitrine та mTagRFP у складі створених генетичних конструкцій рECFP-C3-CTTN, рmTagRFP-N1-CTTN, рmCitrine-C1-PH. Схематичне зображення згенероване у програмі Serial Cloner

з метою визначення внутрішньоклітинної локалізації досліджуваних білків у живих та фіксованих клітинах.

Біоінформатичний аналіз сайтів фосфорилування кіназами ABL та SRC тирозинових залишків в складі кортактину. За допомогою програмного забезпечення GPS 2.1 ми визначили, що білок ABL потенційно може фосфорилувати залишки Y384, Y396, Y409, Y416, Y427, Y433 та Y449 у складі амінокислотної послідовності кортактину (рис. 2а). Для протеїнкінази SRC було передбачено фосфорилування залишків Y297, Y384, Y396, Y409, Y416, Y427, Y433, Y449, Y464 (рис. 2б). Серед них 7 передбачених мішеней є спільними для SRC та ABL, які

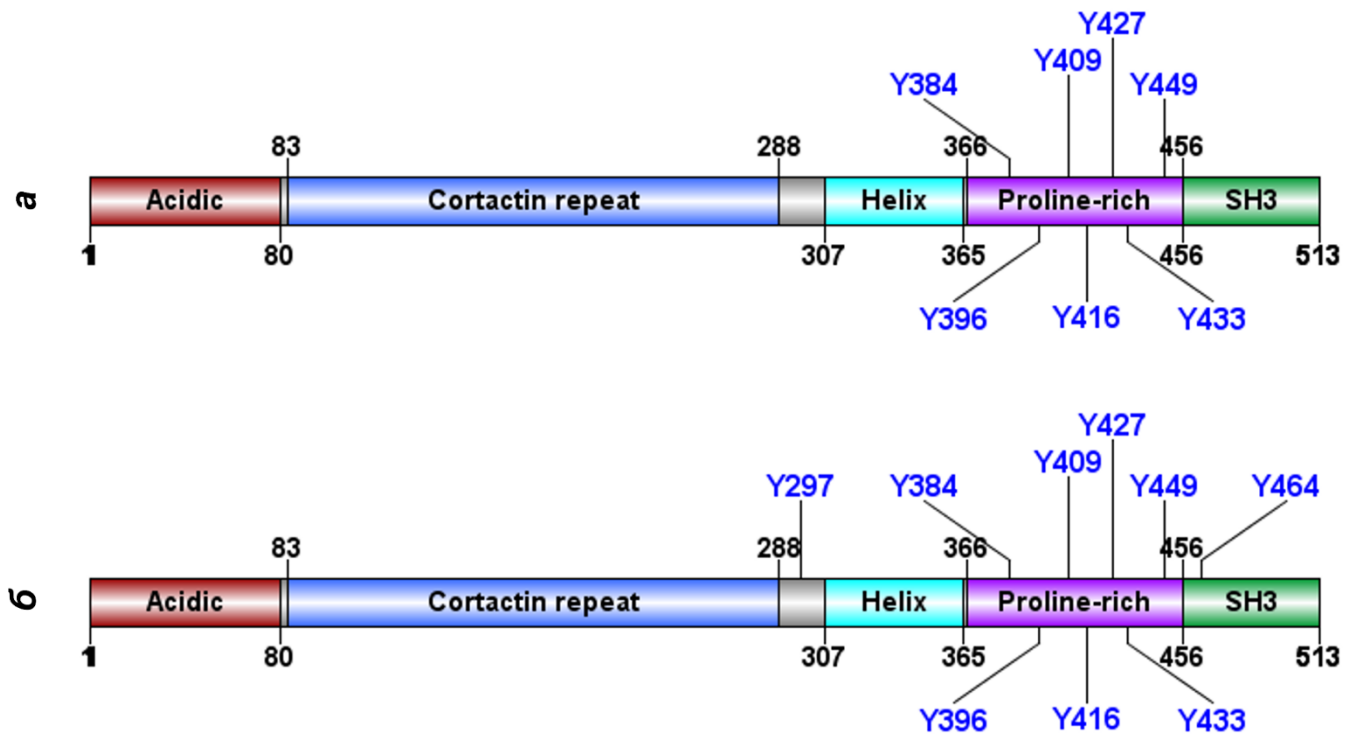


Рис. 2. Біоінформатичний аналіз потенційних сайтів фосфорилування кортактину протеїн-кіназами ABL та SRC. *а* – передбачення для ABL; *б* – передбачення для SRC. На рисунку зображена доменна структура кортактину: acidic – кислий домен, cortactin repeat – ділянка прямих повторів, helix – ділянка спіралі, proline-rich – збагачена проліном ділянка, SH3 – домен гомології SRC

знаходяться в межах пролін-збагаченої ділянки кортактину. Оскільки з літератури відомо, що SRC активує здатність кортактину зв'язуватися з Arp2/3 комплексом та розгалужувати актин за рахунок фосфорилування його збагаченої проліном ділянки (Tehrani *et al.*, 2007), ми припускаємо, що наявність передбачених спільних мішеней для фосфорилування між цими двома білками свідчить про можливу здатність білка ABL активувати кортактин. Потенційним наслідком такої неконтрольованої тирозинкіназної активності ABL може бути дерегуляція розгалуження актину та сигнальних шляхів, в яких бере участь кортактин. В свою чергу це може призвести до онкогенної трансформації клітини та розвитку мієлопроліферативного захворювання.

Розробка мікрослайдів для мікроскопії живих клітин. В даній роботі ми розробили алюмінієву камеру у вигляді мікрослайду, що може використовуватися для прижиттєвої флуоресцентної мікроскопії без використання спеціального предметного столика, так як має розміри стандартного предметного скельця (рис. 3). Прижиттєва флуоресцентна мікроскопія клітин ссавців дозволяє спостерігати внутрішньоклітинні процеси в динаміці. Окрім цього, мікроскопія живих клітин позбавлена артефактів, що можуть виникнути під час фіксації клітин, тому є важливим методом, що додає достовірності даним внутрішньоклітинної локалізації, отриманим на фіксованих клітинах. Однак прижиттєва флуоресцентна мікроскопія ставить певні вимоги до

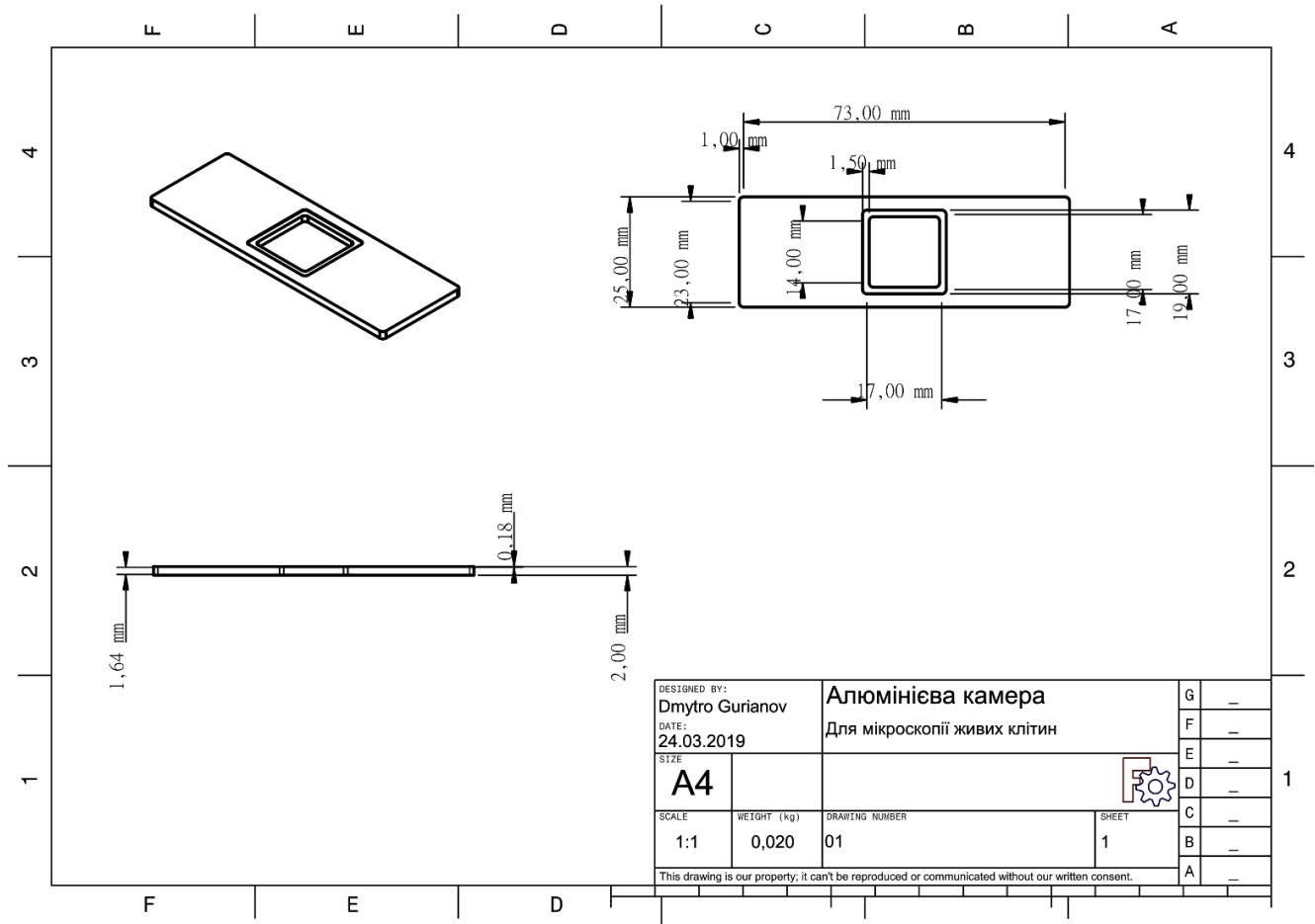


Рис. 3. Креслення алюмінієвої камери для мікроскопії живих клітин, зроблене в програмі FreeCAD. На кресленні зображено модель в площинах X-Y та Y-Z, а також ортогональна проекція

приготування зразків та отримання зображень. Під час отримання зображень необхідно підтримувати сталу температуру та концентрацію CO₂, використовувати середовище без фенолового червоного для запобігання автофлуоресценції, запобігати випаровуванню середовища з ємкості, в якій знаходяться клітини. Останнє є одним з найважчих для контролю. Існує декілька комерційних камер для прижиттєвої мікроскопії. Одна передбачає використання модифікованих пластикових чашок Петрі з отвором на дні, до якого приклеєне покривне скло, інша являє собою набір кілець з нержавіючої сталі, які з'єднуються між собою різьбовим з'єднанням, в той час як клітини з середовищем знаходяться між двома круглими покривними скельцями, затиснутими за допомогою силіконової прокладки. Обидва дизайни потребують наявності спеціального предметного столика на мікроскопі і не вирішують до кінця питання випаровування середовища, так як не є повністю герметичними. Розроблений нами мікрослайд має центральний прямокутний отвір та поглиблення, в які монтується предметні скельця розміром 18*18 мм. Простір між скельцями заповнюється ростовим середовищем, а герметизація відбувається за рахунок харчової силіконової змазки. Анодування алюмінію додатково надає корозійної та механічної стійкості. Таким чином, розроблена нами модель не потребує наявності

спеціального предметного столика та запобігає випаровуванню середовища під час отримання зображень, що надає їй перевагу над існуючими аналогами для прижиттєвої мікроскопії.

Внутрішньоклітинна локалізація кортактину, клатрину та домену PH BCR.

Нами було виявлено, що домен PH білка BCR, кортактин та клатрин співлокалізуються в навколяядерних ділянках у фіксованих клітинах HEK293T (рис. 4), трансфікованих плазмідами pECFP-C3-CTTN, pm-Citrine-C1-PH, pmCherry-clathrin. При цьому домен PH на $53 \pm 3,3$ % 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 (Brodsky *et al.*, 2014). В ядрі клатрин здатен активувати транскрипцію білка p53, що є відомим

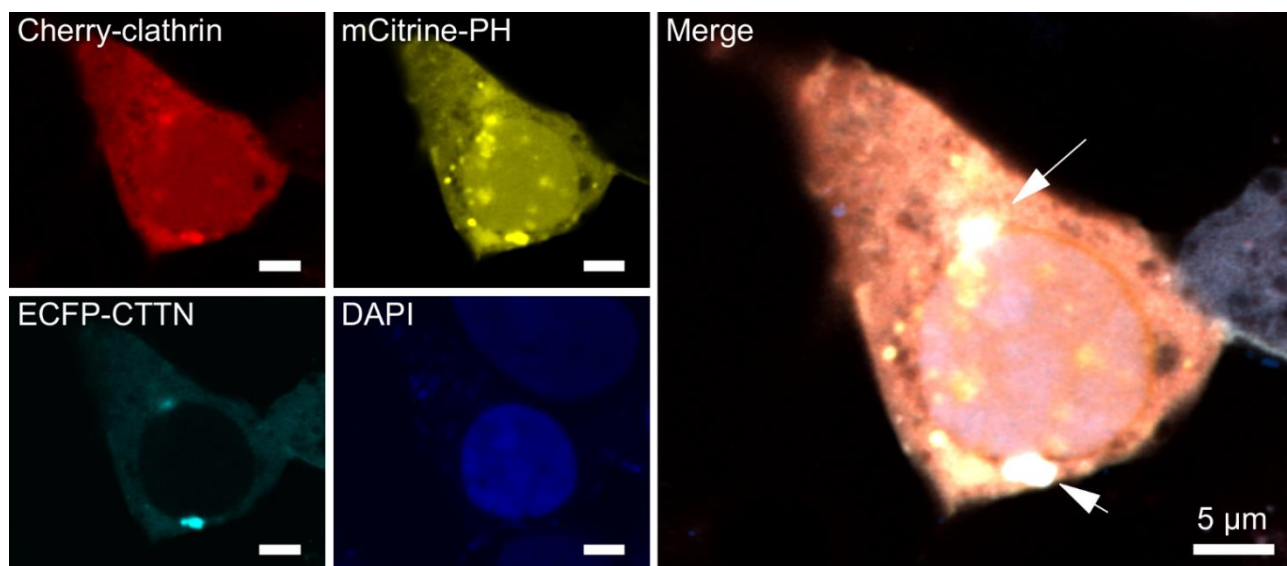


Рис. 4. Флуоресцентна конфокальна мікроскопія фіксованих клітин HEK293T, трансфікованих генетичними конструкціями ECFP-C3-CTTN, mCitrine-C1-PH, mCherry-clathrin та фарбованих DAPI. Стрілками показані точки співлокалізації між клатрином, кортактином та доменом PH біля ядра. Масштаб = 5 мкм

онкосупресором. Також відомо, що клатрин здатен співлокалізуватися з центросомою, що може пояснювати його навколяядерну локалізацію (Foraker *et al.*, 2012). Клатрин може бути фосфорильований SRC кіназою по залишкам 1477 та 1497, а для забезпечення інтерналізації та поглинання рецепторів повинно відбутися його дефосфорильовання (Bonazzi *et al.*, 2011). Оскільки ABL та SRC можуть мати спільні мішені, то ми припускаємо, що конститутивна тирозинкіназна активність BCR-ABL може призводити до порушення нормальної функції клатрину.

Співлокалізація білка BCR та домену PH BCR з клатрином та кортактином у живих клітинах HEK293T. Ми виявили, що у живих клітинах HEK293T

повнорозмірний білок BCR співлокалізується з клатрином у цитоплазматичній структурі, яка, на нашу думку є ранньою ендосомою (рис. 5а). Ендосома є динамічною

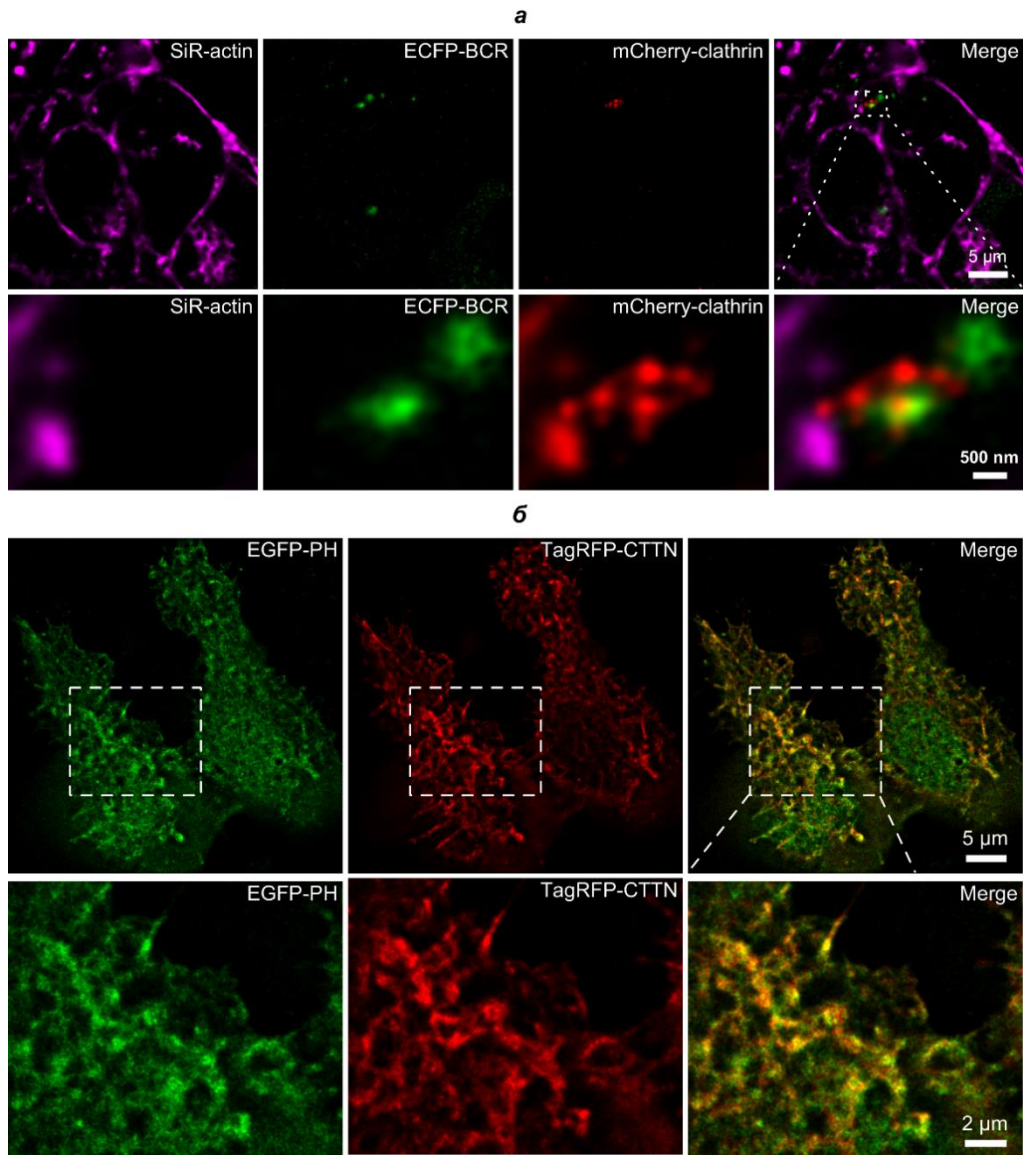


Рис. 5. Флуоресцентна конфокальна мікроскопія живих клітин HEK293T. *а* – трансфікованих генетичними конструкціями ECFP-BCR, mCherry-clathrin та фарбованих SiR-actin; *б* – трансфікованих генетичними конструкціями EGFP-C3-PH та TagRFP-N1-CTTN. Збільшена ділянка на рис 5а – цитоплазматична структура, що формується в місцях співлокалізації клатрину, актину та BCR. Збільшена ділянка на рис. 5б – співлокалізація кортактину та домену PH у імовірних ділянках фокальної адгезії

та плеоморфною структурою, що складається з тонких трубчастих видовжених ділянок діаметром близько 60 нм та великих везикулярних ділянок діаметром 400 нм, що співпадає з отриманим нами зображенням. Домен PH білка BCR здатен співлокалізуватися з кортактином у ділянках адгезії клітин до субстрату. Таким чином ми можемо спостерігати, що білок BCR та домен PH залучені до клатрин-опосередкованого ендосомального сортиру (рис. 5б). 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, про що свідчить той факт, що актин співлокалізується з BCR лише на $0,4 \pm 0,1\%$, а з клатрином — на $2,1 \pm 0,5\%$. У місцях адгезії клітин HEK293T до субстрату ми спостерігали високий рівень співлокалізації між кортактином та доменом РН білка BCR: домен РН співлокалізується з кортактином на $88,4 \pm 2,5\%$, а кортактин співлокалізується з доменом РН на $98,4 \pm 0,4\%$. Ці дані можуть свідчити про залучення домену РН до формування фокальної адгезії.

Оскільки роздільна здатність конфокального мікроскопа обмежена лімітом Аббе, то ми не можемо ідентифікувати два об'єкти, що знаходяться ближче один до одного ніж 200-300 нм. Оскільки формування білкових комплексів відбувається на ближчій відстані, то для виявлення достовірності отриманих результатів співлокалізації ми використали субдифракційну мікроскопію STED, роздільна здатність якої становить 20-40 нм. Нами було виявлено потрійну співлокалізацію між кортактином, клатрином та BCR у клітинах K562 як на конфокальному зображенні так і на зображенні надвисокої роздільної здатності (рис. 6). Ми виявили, що на конфокальному

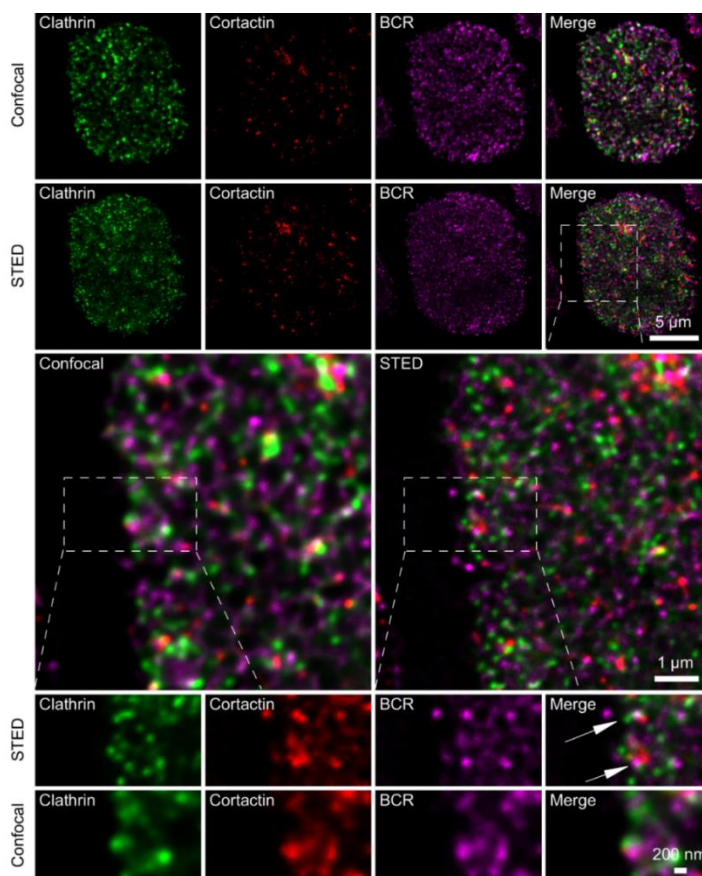


Рис. 6. Флуоресцентна конфокальна та STED мікроскопія фіксованих клітин K562, трансфікованих EGFP-Clathrin та забарвлених антитілами до BCR та кортактину. Стрілки на збільшеній ділянці вказують на ультраструктури в місцях потрійної співлокалізації BCR, кортактину та клатрину, виявлені мікроскопією надвисокої роздільної здатності

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 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 ендцитозу. 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. Ми також визначили структурні особливості внутрішньоклітинної локалізації домену PH у клітинах HEK293T і виявили, що за розміром та формою розподіл домену PH нагадує клатринові везикули (рис. 7а). Ми порівняли наше зображення домену PH із наявним у літературі (Huang *et al*, 2008)

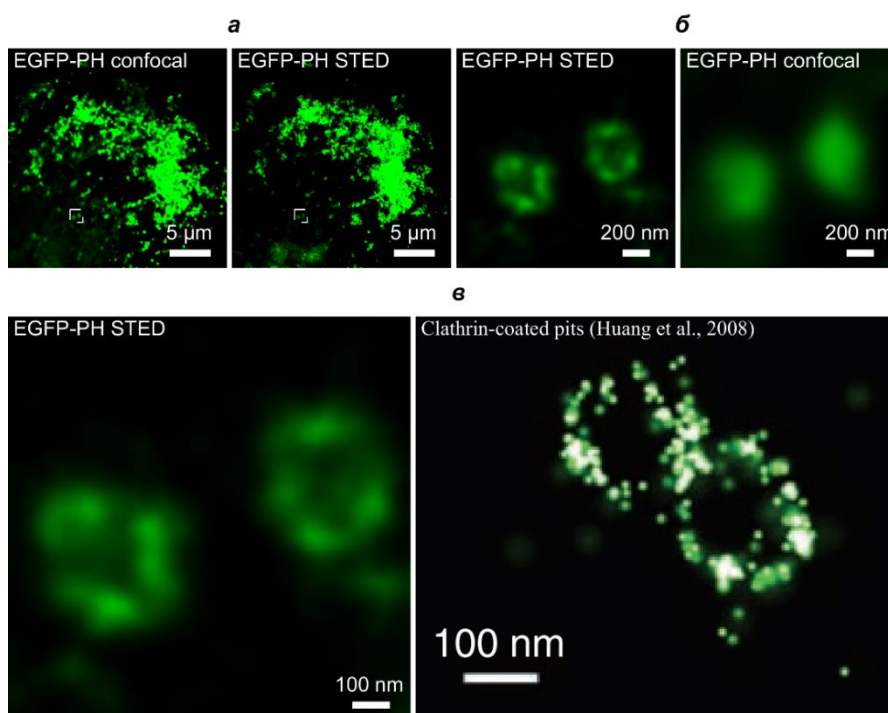


Рис. 7. Конфокальні зображення та STED зображення надвисокої роздільної здатності EGFP-PH у фіксованих клітинах HEK293T. *a* – загальний план; *б* – збільшена ділянка інтересу; *в* – порівняння ідентифікованих ультраструктур з наявним в літературі (адаптовано до Huang *et al*, 2008) субдифракційним зображенням везикул, вкритих клатрином

зображенням везикул, вкритих клатрином, і виявили структурну подібність (рис. 7б). Ми вважаємо, що домен РН може забезпечувати залучення повнорозмірного білка BCR до везикул, вкритих клатрином, за рахунок здатності домену РН взаємодіяти з ліпідами, або ж за рахунок білок-білкової взаємодії між клатрином та доменом РН BCR.

Співлокалізація білка BCR з кортактином у точках розгалуження актину. Процес ендосомального сортиру та клатрин-опосередкованого ендцитозу вимагає скоординованої перебудови мембрани та актинового цитоскелету. Тому наступним етапом нашої роботи було визначити чи залучений білок BCR разом з кортактином у розгалуження актину. Ми виявили, що білок BCR співлокалізується з кортактином у точках розгалуження актинових філаментів у примембранній ділянці фіксованих клітинах K562 (рис. 8a). Частка BCR, що співлокалізується з кортактином та актином

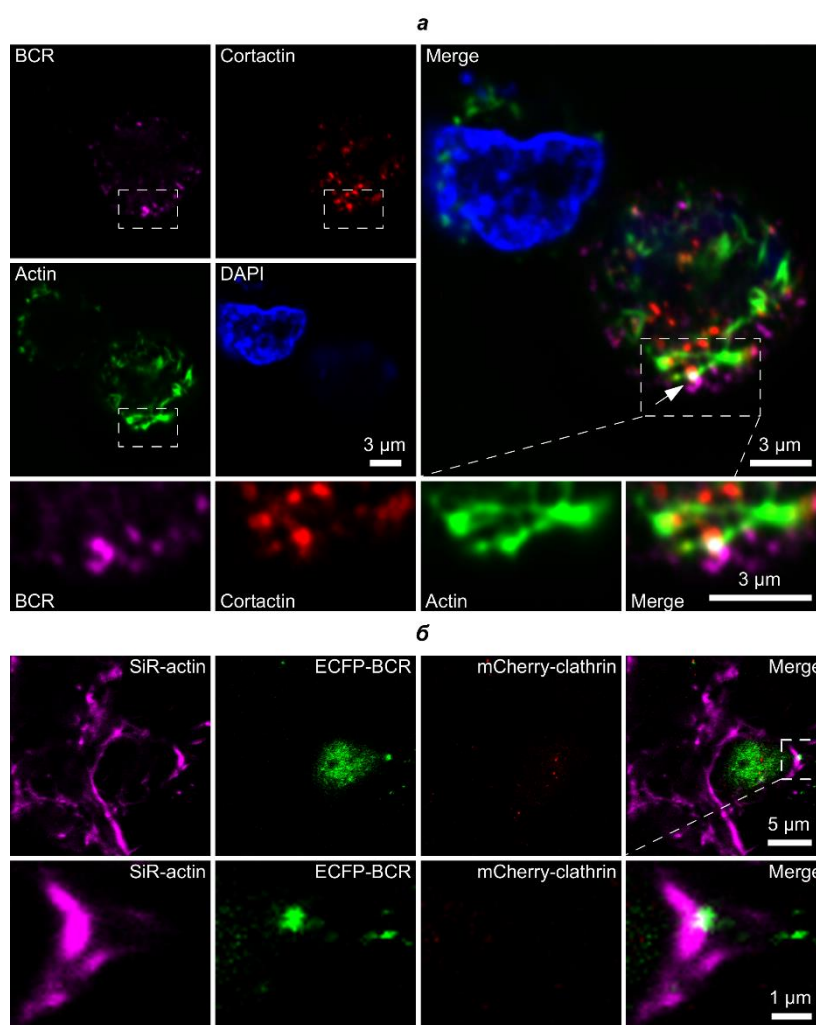


Рис. 8. Конфокальна мікроскопія фіксованих клітин K562, забарвлених FITC-фалоїдином та антитілами до BCR та кортактину (a), та живих клітин HEK293T, забарвлених SiR-actin та трансфікованих ECFP-BCR та mCherry-clathrin (б). На збільшених ділянках показані точки співлокалізації BCR з місцями розгалуження актинових філаментів

становить відповідно $40,7 \pm 2,9\%$ та $56,5 \pm 2,2\%$, $83,7 \pm 1,2\%$ кортактину

співлокалізується з BCR, $88,3 \pm 1,9\%$ — з актином, актин співлокалізується з BCR та кортактином із значеннями коефіцієнтів Мандерса $67,6 \pm 11,2\%$ та $52,9 \pm 5,1\%$ відповідно. Окрім цього, ми виявили співлокалізацію BCR з точкою розгалуження актину в живих клітинах НЕК 293Т (рис. 8б). В живих клітинах BCR на $12,9 \pm 2,9\%$ співлокалізувався з актином та на $4,0 \pm 0,5\%$ — з клатрином; клатрин на $19,7 \pm 4,8\%$ співлокалізувався з актином та на $33,7 \pm 8,9\%$ — з BCR; актин на $0,9 \pm 0,5\%$ співлокалізувався з клатрином та на $9,9 \pm 2,3\%$ — з BCR. Таким чином, ми виявили точкову співлокалізацію BCR з кортактином у точках розгалуження актину, а також залучення BCR у розгалуження актину в живих клітинах. Мікроскопія надвисокої роздільної здатності STED підтвердила результати, отримані за допомогою конфокального мікроскопа (рис. 9), і дозволила виявити, що розміри такої ділянки

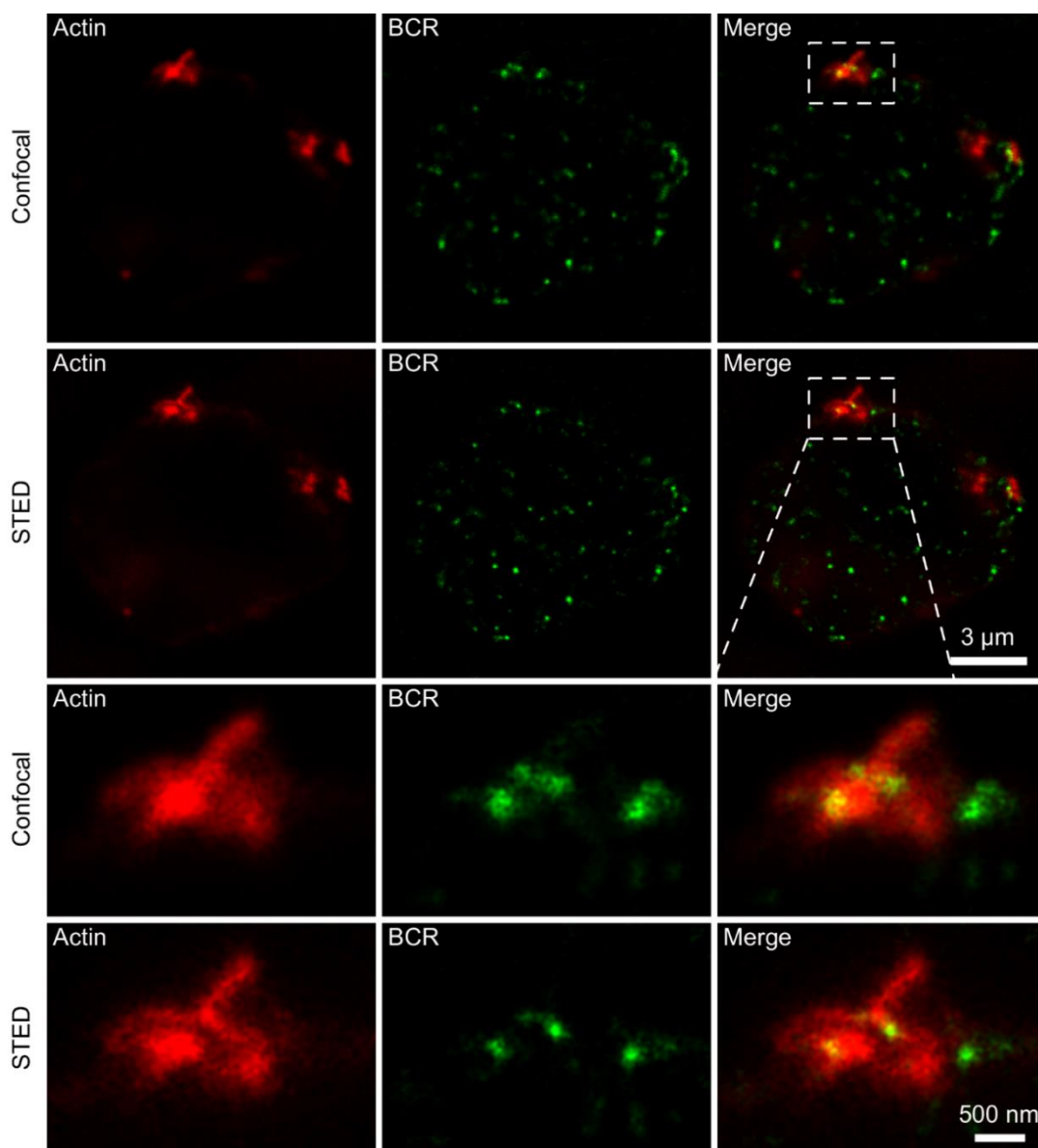


Рис. 9. Конфокальне та STED зображення фіксованих клітин K562, забарвлених антитілами до BCR та ATTO647N-фалоїдином. Збільшена ділянка демонструє співлокалізацію BCR з точками розгалуження актину на субдифракційному рівні у порівнянні з конфокальним зображенням

співлокалізації між BCR та точкою розгалуження актинових філаментів становить приблизно 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.

Співлокалізація BCR та кортактину у ядрі клітини. На попередніх рисунках ми виявили, що в більшості клітин білок BCR та домен PH локалізуються як в ядрі, так і в цитоплазмі. Кортактин, в свою чергу, локалізується виключно в цитоплазмі. Однак, в частині клітин кортактин також міг локалізуватися в ядрі. Ми виявили, що між BCR та кортактином можлива ядерна співлокалізація (рис. 10) в клітинах на

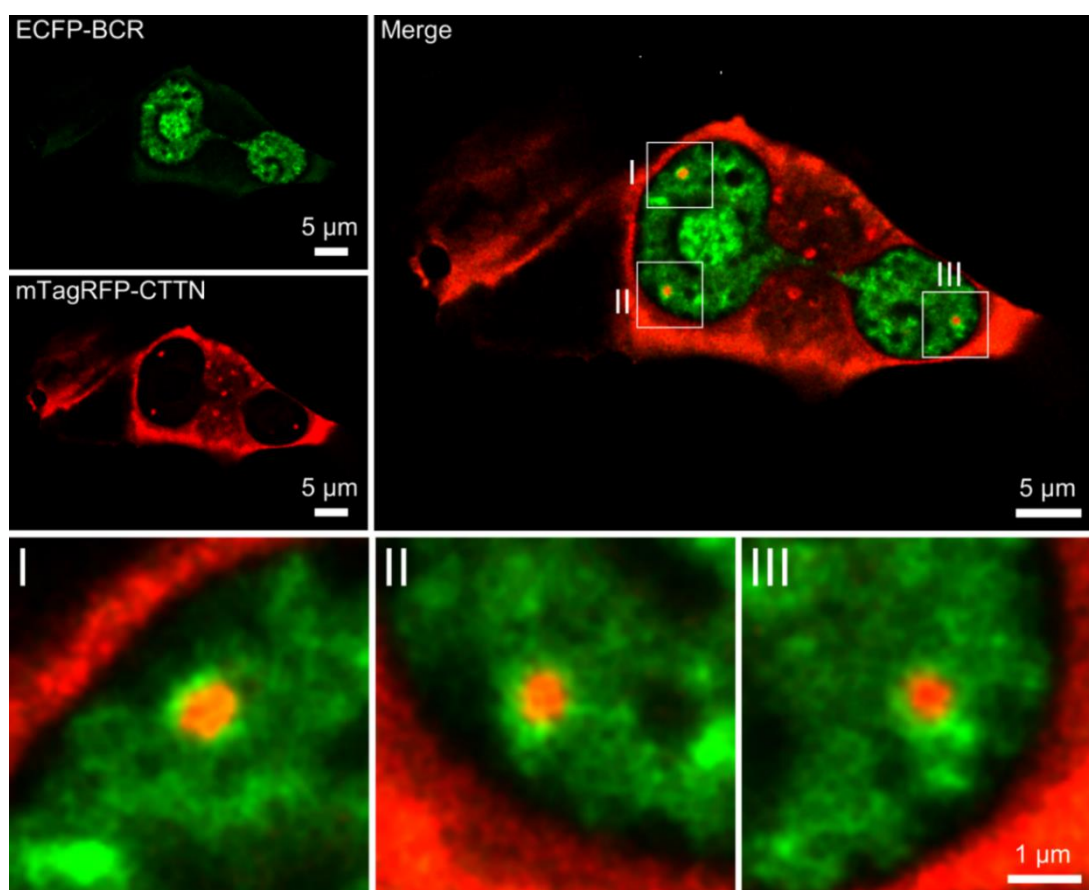


Рис. 10. Конфокальна мікроскопія живих клітин HEK293T, трансфікованих конструкціями ECFP-BCR та mTagRFP-N1-CTTN, які знаходяться на термінальній стадії поділу. I-III – збільшені ділянки співлокалізації між BCR та кортактином у ядрі, де BCR формує кільце навколо точок локалізації кортактину

термінальній стадії поділу, про що свідчить наявність перетяжки між ядрами. 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. 5б, рис.8а), то між ними буде статистично достовірна різниця ($p \leq 0,05$). 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 (Ito *et al.*, 2015). Так як в ядрі присутні білки родини Arg, подібні до тих, що формують Arg 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 (Falahzadeh *et al.*, 2015).

Співлокалізація білка BCR та домену PH BCR з тубуліном. Нами було виявлено, що повнорозмірний білок BCR та кортактин співлокалізуються з точками розгалуження тубулінових філаментів у живих клітинах НЕК293Т (рис. 11а). 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 рЕСФР-С3, що експресує зелений флуоресцентний білок. В контрольних зразках ЕСФР 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 ЕСФР становили відповідно $29,2 \pm 3,5\%$ та $16,2 \pm 2,7\%$, що також є достовірно нижчими показниками у порівнянні з відповідними показниками для ЕСФР-BCR ($p < 0,05$). Відомо, що нуклеація тубулінових філаментів відбувається в центрі організації мікротрубочок, або, як його ще називають, у центросомі. Центросома складається з великої кількості білків, які називають перичентріолярним 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 (Conduit *et al.*, 2015). Порушення функції центросом часто є маркером онкотрансформації клітини (Nigg, 2006), 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. Для виявлення ролі домену PH в такій локалізації білка BCR ми

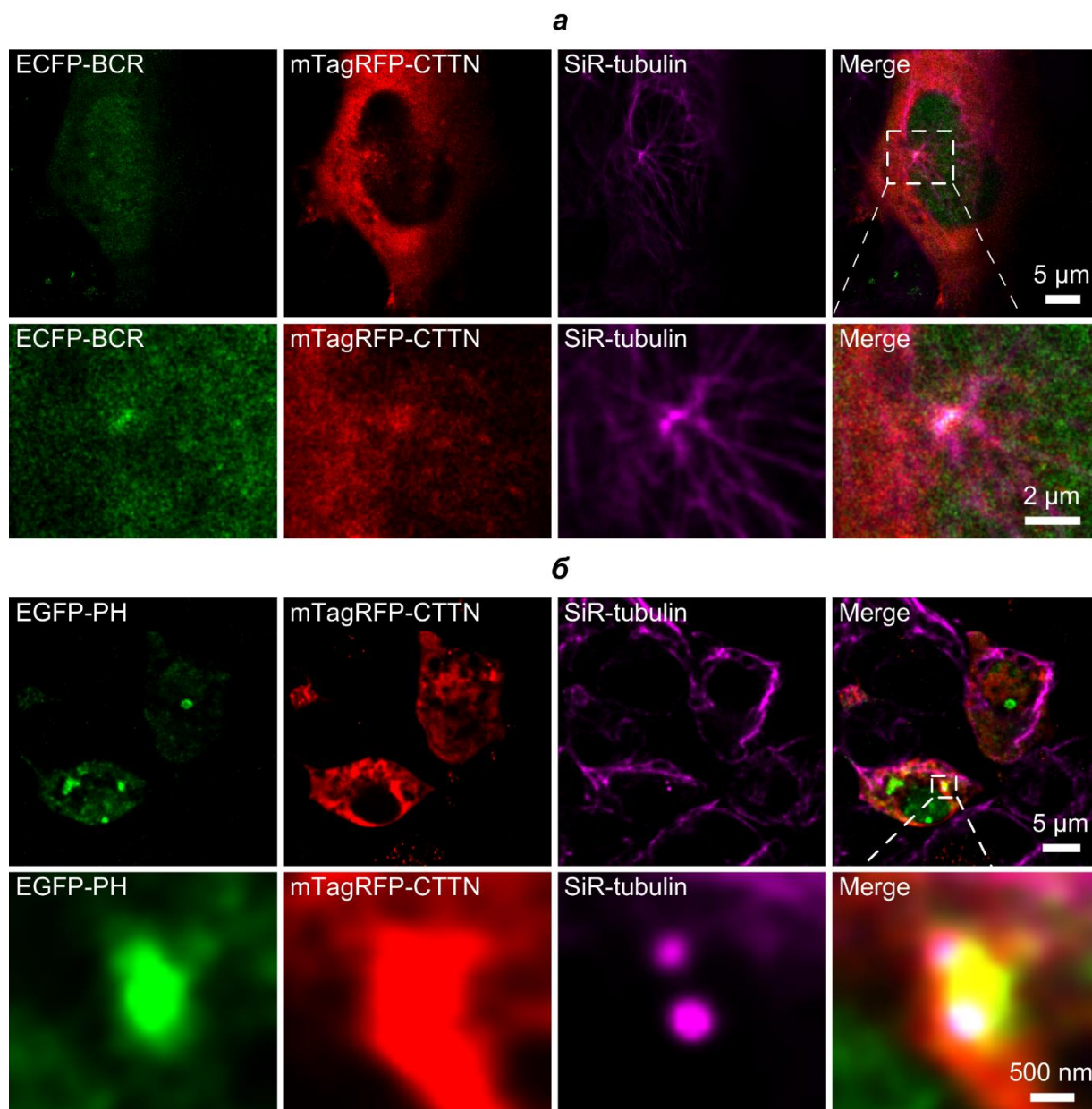


Рис. 11. Конфокальна флуоресцентна мікроскопія живих клітин HEK293T, забарвлених SiR-tubulin. *a* – трансфікованих ECFP-BCR та mTagRFP-N1-CTTN; *b* – трансфікованих EGFP-PH та mTagRFP-N1-CTTN. Збільшені ділянки показують місця співлокалізації повнорозмірного BCR та домену PH BCR з кортактином у точках розгалуження тубулінових філаментів, характерних для центра організації мікротрубочок

трансфікували живі клітини НЕК293Т конструкціями рEGFP-C3-PH, pmTagRFP-N1-CTTN та пофарбували прижиттєвою міткою до тубуліну – SiR-tubulin. Виявили, що домен PH та кортактин співлокалізуються з тубуліном в навколоядерній ділянці (рис. 11б). 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 тубуліну з доменом PH та кортактином становлять відповідно $35,4 \pm 1,5\%$ та $60,1 \pm 6,4\%$. Таким чином, ми вперше показали, що саме домен PH білка BCR забезпечує його співлокалізацію з центросомою. Для підтвердження співлокалізації BCR саме з центросомою, ми використали антитіла до γ -тубуліну, який є маркером центросоми. Виявили, що BCR співлокалізується з γ -тубуліном біля ядра у фіксованих клітинах K562, а також, що в цих ділянках відбувається розгалуження актину (рис. 12а). Коефіцієнти Мандерса для співлокалізації BCR з γ -тубуліном та

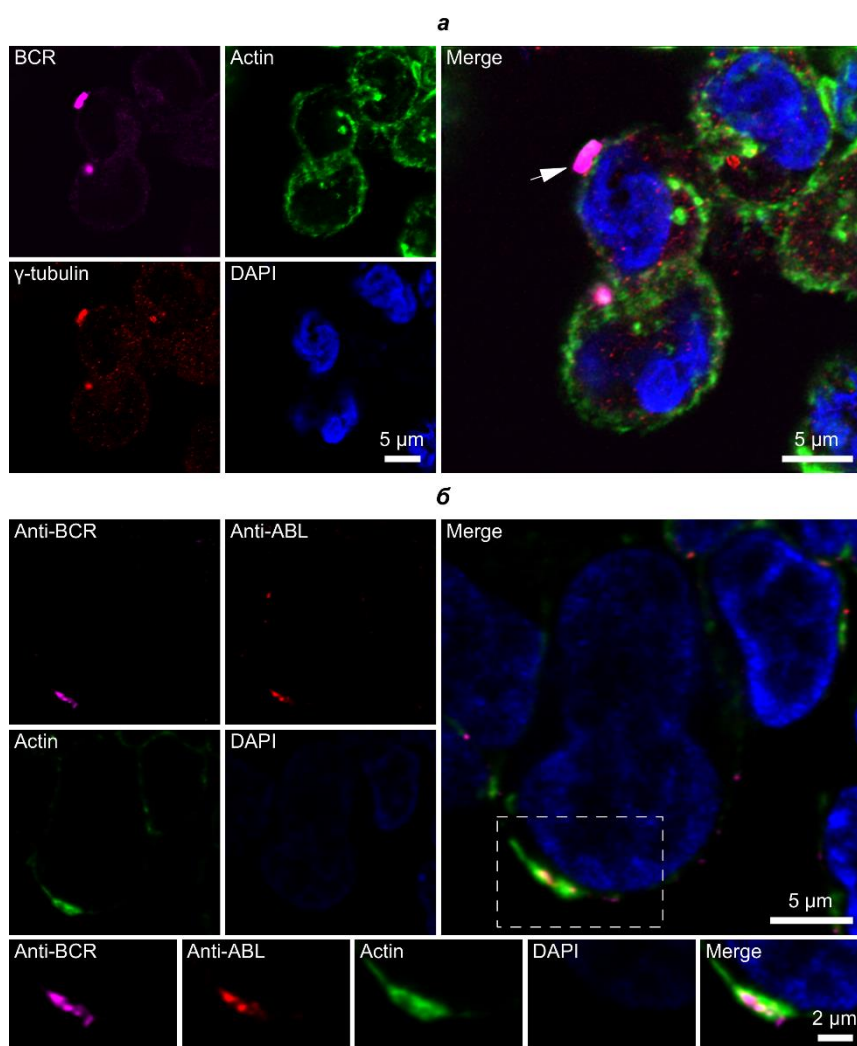


Рис. 12. Конфокальна флуоресцентна мікроскопія фіксованих клітин K562, забарвлених FITC-фаллоїдином та DAPI. *a* – імуномічених антитілами до BCR та γ -тубуліну; *б* – антитілами до BCR та ABL. На збільшених зображеннях показана співлокалізація BCR та ABL в центросомній ділянці розгалуження актину

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 $38,0 \pm 3,6\%$. Використовуючи антитіла до BCR та ABL ми виявили, що білок ABL співлокалізується з навколоядерною ділянкою розгалуження актину лише за присутності BCR (рис. 12б). 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 centrosоми за рахунок домену PH.

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 centrosомою. Ми також виявили співлокалізацію BCR з білком клатрин, що є структурним компонентом клатринових везикул, причому ця співлокалізація спостерігалася як в примембранній ділянці, так і в цитоплазматичному компартменті, що за розмірами нагадує ранню ендосому, так і в навколоядерній ділянці. Можна сказати, що білок BCR є важливим для здійснення мембранно-цитоскелетних перебудов, що здійснюється за рахунок ліпід-зв'язуючої функції домену PH у тандемі з актиноорганізуючою функцією кортактину та клатрину, забезпечуючи таким чином рецепторне сигналювання, ендочитарне сортування інтерналізованих лігандів та структурну цілісність centrosоми. 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, так як тирозинкіназна активність ABL є конститутивною. Наявні підходи у терапії ХМЛ та ГЛЛ полягають у використанні інгібіторів тирозинкіназної 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 розвитку стійкості та необхідності розробки нових поколінь інгібіторів тирозинкінази ABL. Вивчені в даній роботі функціональні зв'язки BCR з кортактином, клатрином та centrosомою роблять можливим розробку альтернативних та політаргетних стратегій терапії Ph⁺ позитивних лейкемій, спрямованих на блокування зв'язування химерного білка з кортактином, клатрином та centrosомою, 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 centrosомним 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 фосфорилування кортактину у збагаченій проліном ділянці, що є спільними для SRC та ABL кінази, і 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 навколоядерній 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 BCR частина білка BCR-ABL за рахунок домену PH співлокалізується з кортактином та γ -тубуліном у центросомній ділянці в місцях розгалуження актину.

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. *(Особистий внесок здобувача: створення плазмідних конструкцій, культуральна робота, трансфекція клітин ссавців, фіксація клітин та імунофлуоресценція, дизайн камери для прижиттєвої мікроскопії, приготування препаратів для мікроскопії, обробка та аналіз зображень)*

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. *(Особистий внесок здобувача: створення плазмідних конструкцій, культуральна робота, трансфекція клітин ссавців, фіксація клітин та імунофлуоресценція, дизайн камери для прижиттєвої мікроскопії, приготування препаратів для мікроскопії)*

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): 78-82 *(Особистий внесок здобувача: створення плазмідних конструкцій, культуральна робота, трансфекція клітин ссавців, приготування препаратів для мікроскопії)*

4. Антоненко С, **Гур'янов Д**, Кравчук І, Телегеев 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. *(Особистий внесок здобувача: культуральна робота, трансфекція клітин ссавців, приготування препаратів для мікроскопії)*

5. Антоненко С, Кравчук І, **Гур'янов Д**, Телегеев 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. *(Особистий внесок здобувача: створення плазмідних конструкцій)*

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. *(Особистий внесок здобувача: створення плазмідних конструкцій, культуральна робота, трансфекція клітин ссавців, приготування препаратів для мікроскопії, біоінформатичний аналіз сайтів фосфорилування)*

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. *(Особистий внесок здобувача: створення плазмідних конструкцій)*

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. *(Особистий внесок здобувача: створення плазмідних конструкцій)*

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, p16.

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, **Гурьянов 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

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., Телегєєв 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.

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.

Робота присвячена вивченню залучення повнорозмірного білка BCR та PH домену BCR у процеси везикулярного транспорту та реорганізації цитоскелету. Виявлено, що білок BCR співлокалізується з кортактином у точках розгалуження актинових філаментів. Виявлено потрібну співлокалізацію між кортактином, клатрином та BCR, що може свідчити про залучення BCR до Arp2/3-залежного поглинання клатринових везикул. Виявлено ультраструктурні особливості співлокалізації BCR з актином, клатрином, та кортактином за допомогою мікроскопії надвисокої роздільної здатності. Вперше показано, що домен PH білка BCR забезпечує заякорювання

повнорозмірного білка до centrosomi, яка є центром регуляції розгалуження актинових філаментів та мікротрубочок. Виявлено структурні особливості точкової співлокалізації між кортактином та BCR в ядрі клітини на термінальній стадії клітинного поділу, що може свідчити про можливу їх участь у реорганізації ядерного актину задля підтримання цілісності ядерної архітектури. Отримані дані розширюють розуміння молекулярних механізмів розвитку хронічної мієлоїдної лейкемії та є підґрунтям для розробки альтернативних підходів до терапії.

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

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 among the most common types of cancer characterized by clonal proliferation of transformed cells, which due to mutations are able to avoid apoptosis and have a selective advantage over differentiated hematopoietic cells. Development of oncohematological disorder due to chromosomal translocation is quite common case. 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. The t(9; 22) (q34; q11) reciprocal translocation between 9 and 22 chromosomes results in fusion of Bcr gene on chromosome 22 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 are associated with different types of leukemia, 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. 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}. Among the candidates for the interaction are cortactin, which belongs to protein family of actin regulators, and β -tubulin, which is one of the two heterodimers that form microtubules.

We determined that PH domain of BCR protein and full-length BCR are able to colocalize with cortactin in the perimembrane region at the points of actin branching and in the sites of cell adhesion to surface. 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 are 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 moiety. To test this hypothesis, we performed a bioinformatic analysis of phosphorylation sites and found that ABL and cortactin activator - SRC kinase share seven predicted sites. 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 cancer cells. We have demonstrated colocalization between BCR and cortactin in the nucleus at the terminal stage of cell division, characterized by the presence of contractile ring between the nuclei. We hypothesize that BCR and cotractin may thus provide the branching of nuclear actin that is required for a coordinated change in the nuclear architecture during cell division.

We hypothesize that data of colocalization with clathrin and cortactin in different cell compartments demonstrate involvement of PH domain of BCR in endosomal trafficking and sorting system, comprising 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 provide 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.

ДЛЯ ПОДАТОК