

ВЗАЄМОДІЯ ОНКОБІЛКА Bcr-ABL З БІЛКОМ GLG1 У КЛІТИНАХ K562: РОЛЬ У ПАТОГЕНЕЗІ ХРОНІЧНОЇ МІЄЛОЇДНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ

С.В. АНТОНЕНКО, І.В. КРАВЧУК, Г.Д. ТЕЛЕГЄЄВ

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ

E-mail: antonenkoimbg@gmail.com

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) — це клональне мієлопроліферативне захворювання, яке характеризується появою гібридного онкобілка Bcr-Abl у результаті реципрокної транслокації між 9 та 22 хромосою. Шляхом мас-спектрометричного аналізу білок GLG1 був визначений як потенційний партнер на взаємодію із PH доменом онкобілка Bcr-Abl. Білок GLG1 це трансмембранний білок, відомий також як MG-160, ESL-1, CFR-1. Порушення у функціонуванні білка GLG1 впливають на адгезію, рухливість, міграцію клітин. У своїй роботі ми вперше показали взаємодію білка GLG1 із онкобілком Bcr-Abl. За допомогою імунофлюорисцентного аналізу та конфокальної мікроскопії ми детектували колокалізацію білка GLG1 та Bcr-Abl онкобілка у комплексі Гольджі. Також ми виявили фосфорильовану за сайтом тирозину форму білка GLG1 у клітинах K562 та спрогнозували Тур сайти фосфорильовання для ізоформ GLG1 білка. Ми вважаємо, що під час взаємодії білків GLG1 і Bcr-Abl у комплексі Гольджі, онкобілок за рахунок своєї Abl частини фосфорильює білок GLG1, таким чином впливаючи на його активність та порушуючи низхідні сигнальні шляхи, що може бути критичним для розвитку і прогресії захворювання.

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ), онкобілок Bcr-Abl, гольджі глікопротеїн 1 (GLG1), комплекс Гольджі, клітини K562.

Вступ. Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) — це мієлопроліферативне захворювання, яке у 95 % випадків характеризується появою цитогенетичного маркера Філадельфії (Ph⁺) хромосоми. Мутація утворюється в результаті реципрокної транслокації t(9;22)(q34;q11), де ген abl 9 хромосоми об'єднується з геном bcr 22 хромосоми [1–5], що стає причиною появи гібридного гену bcr-abl, який за рахунок конститутивної активності тирозинкінази спричиняє злоякісну трансформацію клітин [2, 6–8]. В залежності від місця розташування хромосомної точки розриву в гені bcr, білковий продукт гена

bcr-abl може мати молекулярну масу 190 кДа, 210 кДа або 230 кДа [2, 3, 5, 6, 9]. На пухлинний потенціал онкобілка Bcr-Abl істотно впливають Dbl-гомологічний (DH) і плекстрін гомологічний (PH) домени, які наявні у p210 і p230 формах і відсутні в p190 формі онкобілка Bcr-Abl [9]. Різні форми онкобілка Bcr-Abl пов'язані з різними типами мієлопроліферативних захворювань. Так, форма p190 характерна для пацієнтів з гострою лімфобластною лейкемією, p210 — з хронічною мієлоїдною лейкемією і p230 — з доброякісною нейрофільною формою мієлоїдної лейкемії [1, 2, 5, 6, 9]. Роль доменів Bcr частини онкобілка Bcr-Abl у диференціації лейкемічних стовбурових клітин залишається незрозумілою. За попередніми результатами мас-спектрометричного аналізу було визначено 23 білки, потенційні кандидати на взаємодію з PH-доменом онкопротеїну Bcr-Abl [9]. Одним з таких білків є гольджі глікопротеїн 1 (GLG1), також відомий як гольджі сіалоглікопротеїн (MG-160), E-селектин ліганд 1 (ESL-1) та цистеїн багатий рецептор до фактору росту фібробластів (CFR-1). Ген GLG1 локалізований на 16q22-23. Білок GLG1 складається з 1150 амінокислот у його структурі можна виділити трансмембранний домен і цитоплазматичний хвіст [10, 11]. Завдяки привілейованому положенню у секреторному шляху клітини, білок GLG1 взаємодіє з великою кількістю протеїнів [12–16], зокрема, він є лігандом для E-селектину і виступає в якості рецептора для декількох членів сімейства факторів росту фібробластів (FGF) [14–18]. Інгібування білка GLG1 змінює архітектуру комплексу Гольджі, знижує рівень білка інтегрину β1 і зменшує міграцію ряду пухлинних ліній [13]. Суперекспресія білка GLG1 активує каскад Ras-MAP кіназ і індукує експресію асоціацій генів з опосередкованою інтегрином цитоскелетною системою і геном сімейства білків Rho, що є необхідною умовою для

клітинного метастазування клітин [13, 14]. У нашій роботі ми розглядаємо утворення нового білкового комплексу GLG1/Bcr-Abl як ключову подію у неконтрольованій активації білка GLG1 шляхом тирозинкіназної активності Abl частини Bcr-Abl онкобілка. Ми вважаємо, що гіперактивація білка GLG1 за допомогою онкобілка Bcr-Abl може впливати на здатність клітин до рухливості, міграції та адгезії і, як наслідок, потрапляння недиференційованих клітин у кров'яне русло та прогресування ХМЛ.

Матеріали та методи. *Культура клітин.* Клітини K562 (взяті з банку клітин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Е. Кавецького НАН України) – це лінія людських мієлоїдно-лейкемічних клітин, в яких експресується ізоформа p210 білка Bcr-Abl. K562 клітини культивувались у середовищі RPMI 1640 («Thermo Scientific», США) з додаванням 10%-ної фетальної бичачої сироватки (Biowest, Франція), 100 одиниць/мл пеніциліну і 100 одиниць/мл стрептоміцину («Arterium», Україна). Умови вирощування були +37 °C з 95%-ною вологістю та 5 % CO₂.

Коімунопреципітація. Сефароза G («Sigma», США) попередньо врівноважена в лізис буфері NP40 (150мМ NaCl, 1,0 % Triton X100, 50 мМ Tris-HCl pH 8,0). Для аналізу білок-білкової взаємодії сефароза G інкубувалась зі 100 мкл лізис буфера NP40 та 3 мкл моноклональних антитіл anti-Bcr (G2117, «Santa Cruz Biotechnology», США). Для виявлення фосфорильованих форм білка GLG1, сефароза інкубувалась із 100 мкл лізис буфера NP40 та 3 мкл моноклональних антитіл до фосфотирозину (MA1-82787, «ThermoFisher Scientific», США). Після цього, лізати клітин додавались до суміші сефарози G з відповідними антитілами та інкубувались впродовж 3–4 год при + 4 °C. Лізати клітин K562 отримувались за допомогою лізис буфера NP40 з додаванням PMSF та NaVO₃ (150мМ NaCl, 1,0 % Triton X100, 50 мМ Tris-HCl pH 8,0, 1 мМ PMSF, 2мМ NaVO₃). В контрольному зразку лізат клітин додався до сефарози G без антитіл. Потім часточки сефарози разом з білками, що зв'язались із нею, центрифугувались та відмивались тричі лізис буфером NP40. Буфер для нанесення з b-меркапто-

етанолом (200 мМ Tris-HCl, pH6,8, 400 мМ b-меркаптоетанол, 4 % SDS, 0,01 % бромфеноловий синій, 40 % гліцерин) додавався до зразків та прогрівався протягом 5 хв водяній бані, що кипить. Отримані зразки вивчали за допомогою Western blot аналізу.

Western blot аналіз. Імунопреципітовані зразки після елетрофорезу у 12%-ному SDS-поліакриламідному гелі переносили на мембрану Nitro-cellulose (18186, «Amersham Hybond-C, General Electric», США), та блокували у 0,2%-ному розчині бичачого сироваткового альбуміну (A3059 «Sigma», USA) при + 4 °C протягом ночі. Для виявлення білок-білкових взаємодій мембрани інкубували впродовж 1 год за кімнатної температури спочатку з первинними антитілами: anti-GLG1 антитіла (1 : 1000, PA5-32780, «ThermoFisher Scientific», США), anti-Bcr антитіла (1 : 1000, G2117, «Santa Cruz Biotechnology», США). А потім впродовж 1 год за кімнатної температури з вторинними антитілами кон'югованими з пероксидазою хрину: anti-rabbit (1 : 10000, A6154, «Sigma», США), anti-mouse (1 : 5000, AS003, «ABclonal Technology», США). Для виявлення фосфорильованих форм білка GLG1 мембрани інкубували з первинними антитілами anti-GLG1 (1 : 1000, PA5-32780, «ThermoFisher Scientific», США) впродовж 1 год за кімнатної температури та потім з вторинними anti-rabbit антитілами кон'югованими з пероксидазою хрину (1 : 10000, «ThermoFisher Scientific», США) теж впродовж 1 год за кімнатної температури. Мембрани обробляли ECL буфером (1,5М Tris-HCl pH 8,8, кумарова кислота (14 мг/мл в DMSO), люмінол (44 мг/мл в DMSO), 30 % H₂O₂) та аналізували за хемілюмінесценцією за допомогою Chemidoc («Bio-Rad Laboratories», США).

Біоінформатичний аналіз. Біоінформатичний аналіз сайтів фосфорилування тирозину у білку GLG1 проводили за допомогою вебсерверів Disphos1.3. <http://www.dabi.temple.edu/disphos>, KinasePhos <http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw>, та PhosphoPICK <http://bioinf.scmb.uq.edu.au/phosphopick/phosphopick>.

Імунофлуоресценція та конфокальна мікроскопія. Аналіз імунофлуоресценції проводили на клітинах K562. Клітини вирощували на RPMI 1640 з 10%-ної фетальної бичачої сироватки за температури +37 °C з умов 95%-ної

вологості та 5 % CO₂. Клітини фіксували за допомогою 4 % параформальдегіду та 2 % Triton X-100 у буфері PBS (140 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,8 мМ KH₂PO₄) впродовж 20 хв за кімнатної температури, промивали тричі у PBS та блокували у PBS, що містив 2,5%-ного бичачого сироваткового альбуміну (БСА) впродовж 1 год за кімнатної температури. Щоб визначити внутрішньоклітинну локалізацію білка GLG1 клітини інкубували з anti-GLG1 антитілами (1 : 200, PA5-32780, «ThermoFisher Scientific», США) та anti-Golgi Marker (1 : 200, K2217, «Santa Cruz Biotechnology», США) впродовж 1 год за кімнатної температури. Для визначення колокалізації білка GLG1 з онкобілком Bcr-Abl клітини інкубували з anti-GLG1 (1 : 200, PA5-32780, «ThermoFisher Scientific», США) та anti-Bcr антитілами (1 : 200, G2117, «Santa Cruz Biotechnology», США) впродовж 1 год за кімнатної температури. Клітини промивали тричі за допомогою PBS та інкубували з anti-rabbit, кон'югованими з DyLight550 (1 : 200, SB245608, «ThermoFisher Scientific», США), та anti-mouse антитілами, кон'югованими з DyLight488 (1 : 200, SA234709, «ThermoFisher Scientific», США) впродовж 1 год за кімнатної температури. Після чого клітини тричі промивали PBS. Клітинні ядра візуалізували фарбуванням DAPI протягом 2 хв. Зразки після промивки заключали у середовище, що має захисні властивості проти вигорання CitiFluor™ AF1. Мікроскопію проводили на мікроскопі Zeiss LSM 510 (Німеччина). Для візуального аналізу використовували програмне забезпечення Zeiss LSM Image Browser.

Візуальний та кількісний аналізи. Аналіз результатів проводили на програмному забезпеченні Fiji ImageJ з використанням JACoP плагіну. Коефіцієнт кореляції Пірсона (ККП) та коефіцієнт колокалізації Мандерса (ККМ) були двома основними показниками для оцінки сигналів колокалізації.

Результати досліджень та їх обговорення. *Взаємодія білка GLG1 з онкобілком Bcr-Abl в клітинах K562.* Насьогодні відомо декілька ізоформ білка GLG1. Найдовшою є перша ізоформа білка. Ізоформа два відрізняється від ізоформи 1 відсутністю одного з екзонів. Найменшою є ізоформа 3, вона є коротшою з С-кінця. Найбільш вивчену ізоформу білка на-

звали GLG2, вона має унікальний цитоплазматичний доменом з 24 амінокислотних залишків [16]. Генетичний аналіз показав, що білки GLG1 і GLG2 є продуктами одного і того ж гена, варіанти мРНК GLG1 і мРНК GLG2 отримані за допомогою альтернативного сплайсингу. Відносна кількість мРНК для будь-якої ізоформи відрізняється клітинно-специфічним чином [17]. У клітинах K562 білок GLG1 представлений у трьох ізоформах. Ці дані відомі з літератури та підтверджені в наших дослідженнях Western blot аналізом з використанням anti-GLG1 («ThermoFisher Scientific», USA) антитіл. У своєму дослідженні ми вперше показали взаємодію білка GLG1 з онкопротеїном Bcr-Abl в клітинах K562. Результати отримали за допомогою методу коїмунопреципітації з використанням сефарози G («Sigma», США) і anti-Bcr («Santa Cruz Biotechnology», США) антитіл. Зразки візуалізували шляхом Western blot аналізу з використанням anti-GLG1 («ThermoFisher Scientific», США) та anti-Bcr («Santa Cruz Biotechnology», США) антитіл (рис. 1). Слід зазначити, що білок Bcr-Abl взаємодіє тільки з однією ізоформою білка GLG1, яка найбільш виражена у клітинах K562. Причиною цьому може бути альтернативний сплайсинг GLG1, в результаті якого формуються білки з різними структурними і доменними композиціями, що призводить до збільшення ймовірності взаємодії в разі однієї ізоформи або втрати специфічного молекулярного зв'язування у випадку інших ізоформ [19]. Крім того, різні ізоформи білка можуть бути критичними для різних сигнальних шляхів і виконувати різні функції в клітині. Ми вважаємо, онкопротеїн Bcr-Abl за рахунок неконтрольованої кіназної активності впливає на функції білка GLG1, таким чином порушуючи низхідні сигнальні шляхи, що може бути критичним для розвитку і прогресії захворювання.

Колокалізація білка GLG1 з онкопротеїном Bcr-Abl у клітинах K562. В залежності від типу клітин, білок GLG1 може бути локалізований у комплексі Гольджі або на мембрані клітини. Основним місцем локалізації білка GLG1 в комплексі Гольджі є медіальні цистерни, в цис- і транс-цистернах він зустрічається рідко. Утримання білка GLG1 в комплексі Гольджі

забезпечує його С-термінальна область [18]. У комплексі Гольджі білок *GLG1* є стабільним в той час як поза комплексом досить нестійкий. Проте, значна частина білка *GLG1* може локалізуватися на мембрані клітини [10, 15]. Мембранна локалізація білка особливо добре виражена в клітинах 32Dc13, нейтрофілах і лейкоцитах [15]. Вважається, що локалізація білка *GLG1* на клітинній мембрані є специфічною для ізоформи білка з коротким цитоплазматичним хвостом [10, 11]. Протеолітична модифікація С-кінцевого домену може модулювати афінність *GLG1* до партнерів зв'язування, що призводить до деякого «витоку» білка на клітинну мембрану. Слід зазначити, що в пухлинних клітинах локалізація білка *GLG1* майже виключно в комплексі Гольджі [13]. За допомогою імунофлуоресцентного аналізу та конфокальної мікроскопії ми встановили, що для клітинної лінії мієлоїдної лейкемії людини (*K562*) характерним є переважна локалізація білка *GLG1* у комплексі Гольджі (рис. 2). Функція білка *GLG1* в комплексі Гольджі ще не повністю охарактеризована. Вважається, що, крім вже відомих функцій, білок *GLG1* у комплексі Гольджі може виконувати роль шаперону, який необхідний для виконання функцій факторів росту у клітині. Тому з'ясування функцій білка *GLG1* в комплексі Гольджі видається нам досить важливим та перспективним, особливо якщо мова йде про онкопатологію.

Основним місцем локалізації онкобілка *Vcr-Abl* у клітині є цитоплазма, проте різні ізоформи білка мають різні особливості локалізації, так ізоформа *p190* рівномірно розподіляється по цитоплазмі, не маючи чіткої локалізації, а для ізоформи *p210* локалізація пов'язана з ядром і комплексом Гольджі [9]. Вважається, що особливості локалізації ізоформ обумовлені доменом РН, який присутній в ізоформі *p210* і відсутній в ізоформі *p190*. І можливо, саме особливості субклітинного розташування ізоформ *p190* і *p210* впливають на спектр прояву лейкемії [9]. Дослідження локалізації білка *GLG1* і онкопротеїну *Vcr-Abl* в клітинах *K562* здійснили за допомогою методу імунофлуоресцентного аналізували з використанням anti-*GLG1* («ThermoFisher Scientific», США), anti-

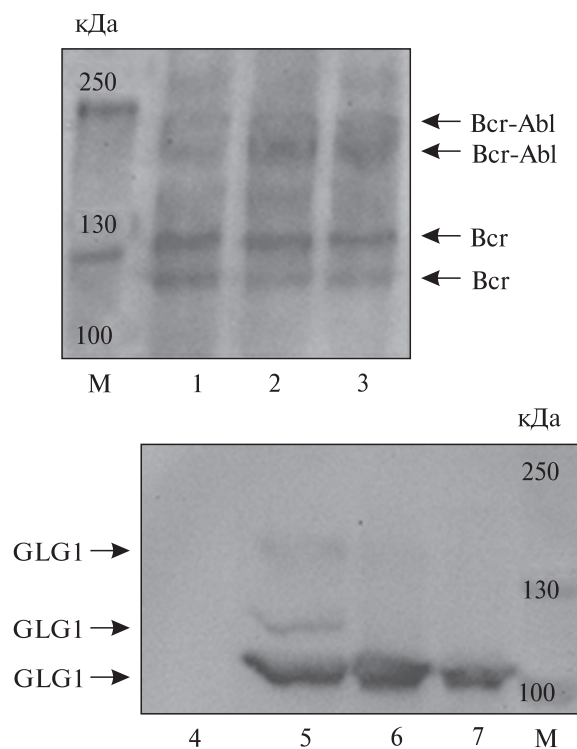


Рис. 1. Результати коімунопреципітації (Western blot аналіз): 1 – експресія онкобілку *Vcr-Abl* в клітинах *K562*, 2, 3 – результати коімунопреципітації, білок *Vcr-Abl*, 4 – негативний контроль, результати інкубації сефарози *G* з лізатами *K562* без антитіл, 5 – експресія білку *GLG1* в клітинах *K562*, 6, 7 – результати коімунопреципітації, білок *GLG1*, М – маркер молекулярних мас Plus Prestained 10–250 кДа Protein Ladder (Thermo Scientifir)

Vcr («Santa Cruz Biotechnology», США) анти-тіл та конфокальної мікроскопії. Шляхом накладання двох зображень за допомогою програмного забезпечення Zeiss LSM Image Browser ми виявили перекриття сигналів локалізації («точки злиття») *GLG1* і *Vcr-Abl* білків, що свідчить про їх колокалізацію у клітинах *K562* (рис. 3). Графічний і кількісний аналіз отриманих результатів проводили за допомогою плагіна JACoP програмного забезпечення Fiji. Графічний аналіз відображає інтенсивність досліджуваних каналів. Отримана діаграма розсіяння відображає перекриття сигналів локалізації білків *GLG1* і *Vcr-Abl*, що є додатковим свідченням їх колокалізації.

Коефіцієнт кореляції Пірсона (ККП) є коефіцієнтом лінійної кореляції, він вимірюється

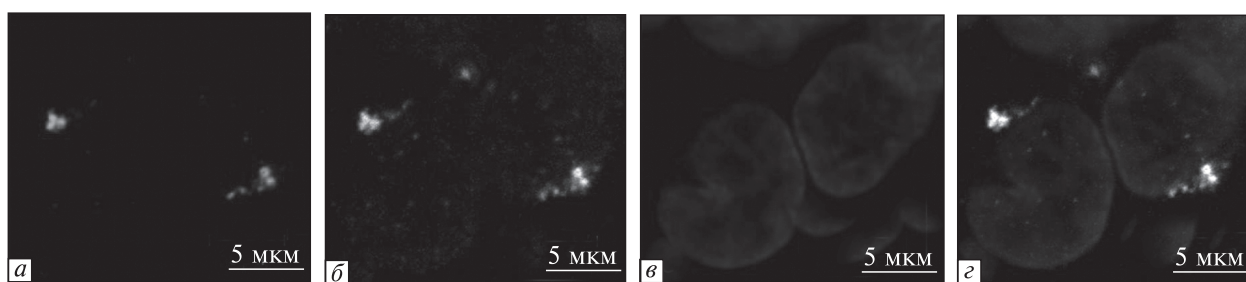


Рис. 2. Результати конфокальної мікроскопії, визначення внутрішньоклітинної локалізації білка GLG1 в клітинах K562 методом імунофлуоресценції: *a* – експресія білка GLG1, *б* – маркер комплексу Гольджі, *в* – флуоресценція DAPI, *г* – накладання сигналів локалізації білка GLG1 з маркером комплексу Гольджі

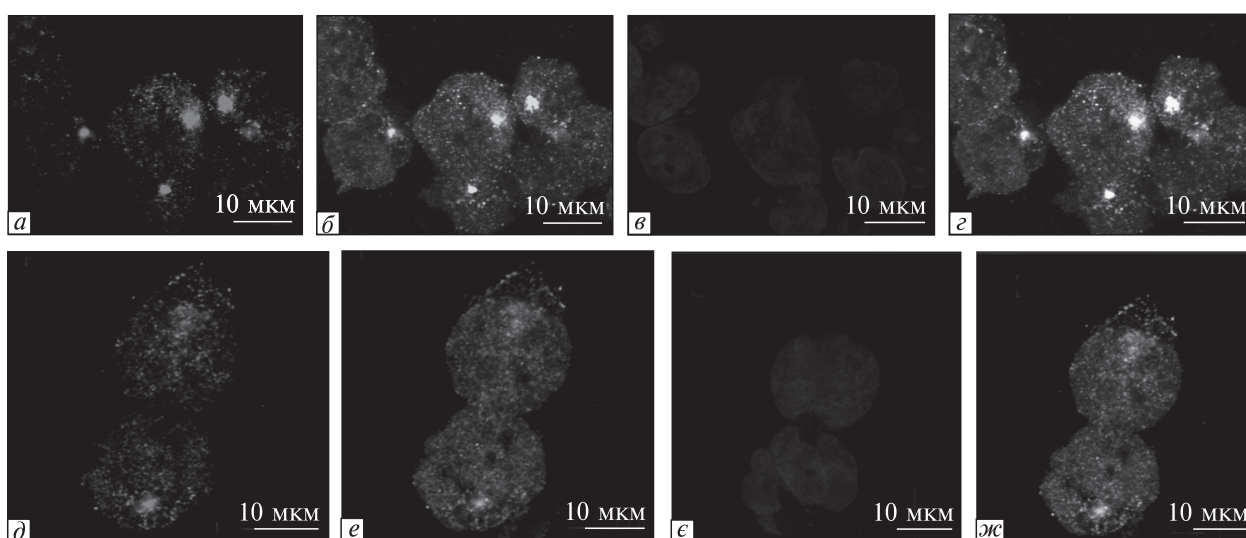


Рис. 3. Результати конфокальної мікроскопії, імуно-флуоресцентний аналіз колокалізації білка GLG1 і онкопротеїну Vsg-Abl в клітинах K562: *a, д* – локалізація білка GLG1; *б, e* – локалізація білків Vsg-Abl; *в, є* – флуоресценція DAPI; *г, ж* – накладання сигналів локалізації білків GLG1 і Vsg-Abl

в діапазоні від -1 до 1, де 1 – лінійно пов'язаний, 0 – часткова кореляція, 1 – абсолютна різниця [20,21,22]. Ми визначили, що ККП для білків GLG1 і Vsg-Abl становить 0,733, що свідчить про високий рівень кореляції. Враховуючи, що пропорційний розподіл, не завжди означає колокалізацію білків, ми також визначили коефіцієнт колокалізації Мандерса (ККМ), який є більше прийнятним для біологічних досліджень, які не можна охарактеризувати простою, лінійною моделлю, що лежить в основі ККП [20–22]. ККМ забезпечує не лише статистичну обробку, а й відображає кількість сигналів перекриття локалізації білка. ККМ визначається в діапазоні від 0 до 1, де 0 – відсутність колокалізації, а 1 – повне перекриття локаліза-

ції білків сигнальних білків [20–22]. Ми показали, що ККМ для білка GLG1 і онкопротеїну Vsg-Abl становить: $M1 = 0,992$ (показник, що вказує наскільки показник А, перекривається з показником В), $M2 = 0,443$ (показник, що вказує наскільки показник В, перекривається з показником А), де А є білком GLG1, а В – онкобілком Vsg-Abl. З отриманих результатів зрозуміло, що білок GLG1 майже повністю колокалізується з онкобілком Vsg-Abl, в той час як сам онкобілок лише частково локалізується з білком GLG1, що пояснюється тим, що окрім комплексу Гольджі значна частина онкобілка Vsg-Abl локалізується у цитоплазмі та ядрі клітини. Таким чином, результати кількісного аналізу, підтвердили високий рівень перекриття

сигналів локалізації білків GLG1 і Bcr-Abl, що свідчить про їх колокалізацію у клітинах K562.

Фосфорилування білка GLG1 у клітинах K562 та його можлива роль в прогресуванні ХМЛ. Онкобілок Bcr-Abl за рахунок Abl частини має високу тирозин-кіназну активність, що призводить до неконтрольованого фосфорилування білків на своєму шляху. Аномальний рівень тирозинкіназної активності корелює з розвитком лейкемії і призводить до аномального числа мієлоїдних клітин [2, 3, 8, 9, 23]. Клітини K562 вивчали за допомогою методу коїмунопреципітації з використанням anti-phosphotyrosine антитіла («ThermoFisher Scientific», США). Отримані результати аналізували за допомогою Western blot аналізу з використанням anti-GLG1 («ThermoFisher Scientific», США) та anti-Rabbit («ThermoFisher Scientific», США) антитіл. Таким чином, ми виявили фосфорилувану за Tyr сайтом ізоформу білка GLG1 у клітинах K562 (рис. 4).

За допомогою Disphos 1.3., KinasePhos та PhosphoPICK ми передбачили цілий ряд можливих сайтів фосфорилування за тирозином у послідовності білка GLG1. Так, для ізоформ 1 та 3, найбільша вірогідність фосфорилування характерна для Y823, Y878 сайтів (для ізоформи 2 вони відповідають Y812, Y867), дещо з меншою вірогідністю можуть бути можуть бути фосфорильовані Y214, Y383, Y400, Y426, Y564, Y932, Y975 сайти (для ізоформи 2 відповідають Y203, Y389, Y415, Y553, Y590, Y415, Y912, Y964 сайтам). Ми вважаємо, що, виявлена фосфорильована форма GLG1 білка в клітинах K562 є результатом його взаємодії з онкобілком Bcr-Abl, який фосфорилує свої білки партнери завдяки кіназній активності Abl частини. Неконтрольоване фосфорилування білка GLG1 може стати причиною гіперактивації його функцій. Враховуючи, що білок GLG1 має високу спорідненість до взаємодії білків, зміни в його функціональній активності можуть порушувати низхідні сигнальні шляхи, впливаючи на ряд важливих процесів, таких як рухливість, адгезія, міграція клітини (рис. 5). Так, зокрема, білок GLG1 є лігандом для E-селектину та факторів росту фібробластів (FGF), таких як FGF-1, -2, -4, -18 та можливо -3 [14–18]. Надмірна експресія GLG1 білка активує Ras-MAP кіназний кас-

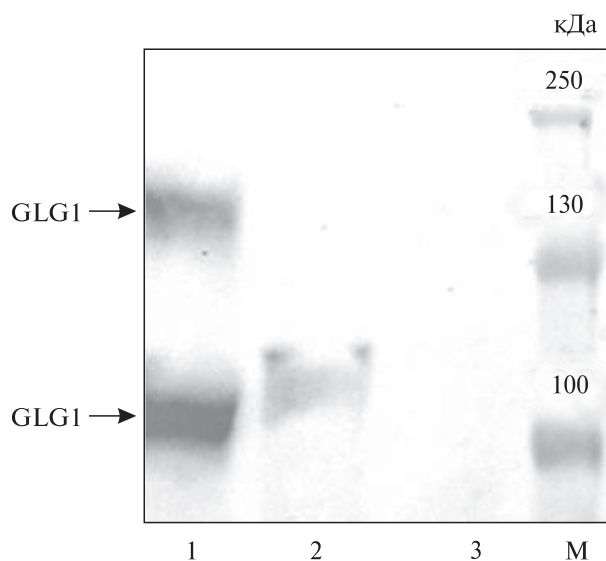


Рис. 4. Результати коїмунопреципітації (Western blot аналіз): 1 – експресія білка GLG1 у клітинах K562, 2 – фосфорильована форма білка GLG1 за Tyr сайтом, 3 – результати інкубації сефарози G з лізатами клітин K562 без антитіл, M – маркер молекулярних мас Plus Prestained 10-250kDa Protein Ladder (Thermo Scientific)

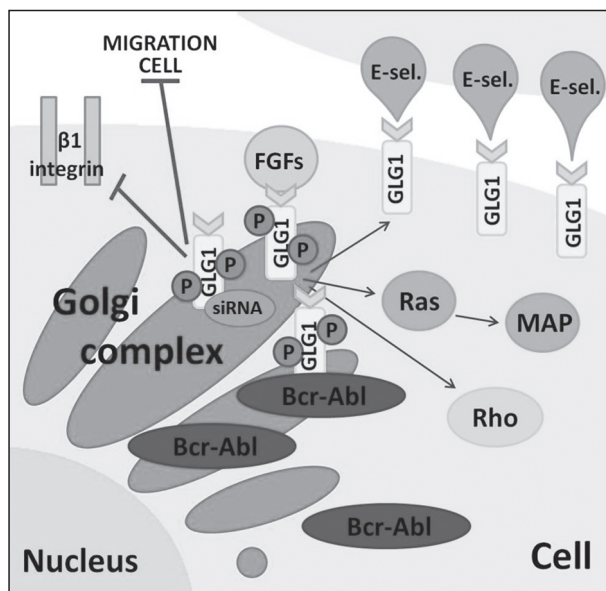


Рис. 5. Топографія та можливі сигнальні шляхи у яких бере участь білок GLG1 у клітинах K562

кад та індукує експресію генів білків родини Rho [13,14]. Пригнічення GLG1 за допомогою siRNA знижує рівень білка інтегрину $\beta 1$, змі-

нює його інтерналізацію/рециклінг та інгібує міграцію ряду ракових клітинних ліній [13].

Основний етіологічний момент в розвитку ХМЛ — це формування гібридного Bcr-Abl гену/білку, який визначає підвищений рівень тирозинкіназної активності. В той же час, реалізація цієї активності визначається просторовою та часовою локалізацією онкобілка [24, 25]. Як показано в експериментальних даних, така активність багато в чому залежить від Bcr частини гібридного гену, який визначає взаємодію з різними клітинними елементами [9]. Таким чином, локалізація онкобілка Bcr-Abl в комплексі Гольджі та його взаємодія з GLG1 може створювати сприятливі умови для метастазів клітин та прогресії ХМЛ.

Висновки. За допомогою методу коімунопреципітації встановили взаємодію білка GLG1 з онкобілком Bcr-Abl в клітинах K562. Шляхом імунофлуоресцентного аналізу та конфокальної мікроскопії, з'ясували, що основним місцем локалізації GLG1 білка у клітинах K562 є комплекс Гольджі, що характерно для ракових клітин. Детектували колокалізацію GLG1 і Bcr-Abl білків у комплексі Гольджі. Коефіцієнт кореляції Пірсона (PCC) для GLG1 та Bcr-Abl білків був 0,733, що вказує на високий рівень кореляції. Коефіцієнти колокалізації Мандерса (MCC) були $M1 = 0,992$, $M2 = 0,443$, що свідчить про високий рівень колокалізації GLG1 та Bcr-Abl білків. Виявлено фосфорильовану за сайтом тирозину форму білка GLG1 у клітинах K562. За допомогою біоінформатичного аналізу було передбачено можливі сайти фосфорильовання для білка GLG1, так для ізоформи 1 і 3 це Y823, Y878 сайти, для ізоформи 2 вони відповідають Y812, Y867 сайтам. Ми вважаємо, що під час взаємодії білків GLG1 і Bcr-Abl у комплексі Гольджі, онкобілок за рахунок своєї Abl частини фосфорильовує білок GLG1, що призводить до зміни його активності, порушення низхідних сигнальних шляхів та прогресування ХМЛ.

Bcr-Abl ONCOPROTEIN INTERACTS WITH GLG1 IN K562 CELLS: ROLE IN PATHOGENESIS OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

S.V. Antonenko, I.V. Kravchuc, G.D. Telegееv

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv

E-mail: antonenkoimbg@gmail.com

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative disease characterized by the appearance of a hybrid Bcr-Abl oncoprotein as a result of reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22. GLG1 protein was identified as a potential partner for interaction with the PH domain of the Bcr-Abl oncoprotein by mass spectrometric analysis. GLG1 protein is a transmembrane protein, also known as MG-160, ESL-1, CFR-1. Disruption in the functioning of the GLG1 protein affects adhesion, mobility, and migration of cells. In our work, we first demonstrated the interaction of the GLG1 protein and Bcr-Abl oncoprotein. Using immunofluorescent analysis and confocal microscopy, we detected colocalization of GLG1 protein and Bcr-Abl oncoprotein in the Golgi complex. We also detected thymosine phosphorylated form of the GLG1 protein in K562 cells and predicted Tyr phosphorylation sites for isoforms of GLG1 protein. We believe that during the interaction of GLG1 and Bcr-Abl proteins in the Golgi complex, oncoprotein phosphorylates the GLG1 protein due to its Abl part, thus affecting its activity and disrupting the downstream signaling pathways that may be critical for the development and progression of the disease.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОНКОБЕЛКА Bcr-Abl С БЕЛКОМ GLG1 В КЛЕТКАХ K562: РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОЙ МИЕЛОИДНОЙ ЛЕЙКЕМИИ

С.В. Антоненко, И.В. Кравчук, Г.Д. Телегеев

Хроническая миелоидная лейкемия (ХМЛ) — это клональное миелопролиферативное заболевание, характеризующееся появлением гибридного онкобелка Bcr-Abl в результате реципрокной транслокации между 9 и 22 хромосомой. Путем масс спектрометрического анализа белок GLG1 был определен как потенциальный партнер на взаимодействие с PH доменом онкобелка Bcr-Abl. Белок GLG1 это трансмембранный белок, известный также как MG-160, ESL-1, CFR-1. Нарушения в функционировании белка GLG1 влияют на адгезию, подвижность, миграцию клеток. В своей работе мы впервые показали взаимодействие белка GLG1 с онкобелком Bcr-Abl. С помощью иммунофлуоресцентного анализа и конфокальной микроскопии мы детектировали колокализацию белка GLG1 и онкобелка Bcr-Abl в комплексе Гольджи. Также мы обнаружили фосфорилированную за сайтом тирозина форму белка GLG1 в клетках K562 и спрогнозировали Tyr сайты фосфорильовання для изоформ GLG1 бел-

ка. Мы считаем, что при взаимодействии белков GLG1 и Bcr-Abl в комплексе Гольджи, онкобелок за счет своей Abl части фосфорилирует белок GLG1, таким образом влияя на его активность и нарушая нисходящие сигнальные пути, что может быть критичным для развития и прогрессии заболевания.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ:

- Salem, A., Loghavi, S., Tang, G., Huh, Y.O., Jabbour, E.J., Kantarjian, H., Wang, W., Hu, S., Luthra, R., Medeiros, L.J., and Khoury, J.D., Myeloid neoplasms with concurrent *BCR-ABL1* and *CBFB* rearrangements: A series of 10 cases of a clinically aggressive neoplasm, *Am. J. Hematol.*, 2017, vol. 92, no. 6, pp. 520–528. doi: org/10.1002/ajh.24710.
- Flis, S., Chojnacki, T. Chronic myelogenous leukemia, a still unsolved problem: pitfalls and new therapeutic possibilities, *Drug. Design. Development and Therapy*, 2019, vol. 13, pp. 825–43. doi: 10.2147/DDDT.S191303.
- Telegeev, G.D., Dubrovskaya, V.A., Nadgorna, V.A., Dybkov, M.V., Zavelevich, M.P., Maliuta, S.S., and Gluzman, D.F., Immunocytochemical study of Bcr and Bcr-Abl localization in K562 cells, *Experimental. oncology*, 2010, vol. 32, no. 2, pp. 81–3.
- Quintás-Cardama, A., Cortes, J. Molecular biology of *bcr-abl1*–positive chronic myeloid leukemia, *Blood*, 2009, vol. 113, pp. 1619–30. doi: 10.1182/blood-2008-03-144790.
- Ross, T.S., Mgbemena, V.E. Re-evaluating the role of BCR/ABL in chronic myelogenous leukemia, *Mol Cell Oncol*, 2014, vol. 1, no. 3, pp. 963450. doi: 10.4161/23723548.2014.963450.
- Järes M., Johnels P., Agerstam H., Lassen C., Rissler M., Edén P. Expression of P190 and P210 BCR/ABL1 in normal human CD34(+) cells induces similar gene expression profiles and results in a STAT5-dependent expansion of the erythroid lineage, *Experimental. hematology*, 2009, vol. 37, no. 3, pp. 367–75. doi: 10.1016/j.exphem.2008.11.003.
- Aladag, E., Haznedaroğlu, I.C. Current perspectives for the treatment of chronic myeloid leukemia, *Turc. J. Med. Sci.*, 2019, vol. 11, no. 49(1), pp. 1–10. doi: 10.3906/sag-1810-81.
- Colicelli, J., ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity, *Sci Signal*, 2010, vol. 14, no. 3, pp. 139–41.
- Miroshnychenko, D., Dubrovskaya, A., Maliuta, S., Telegeev, G., and Aspenström, P., Novel role of pleckstrin homology domain of the Bcr-Abl protein: Analysis of protein-protein and protein-lipid interactions, *Exp. Cell. Res.*, 2010, vol. 316, no. 4, pp. 530–42. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.11.014.
- Zarbock, A., Ley, K., McEver, R.P., and Hidalgo, A., Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow, *Blood*, 2011, vol. 118(26), pp. 6743–51. doi: 10.1182/blood-2011-07-343566.
- Mourelatos, Z., Gonatas, J.O., Cinato, E., and Gonatas, N.K., 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.*, 1996, vol. 15, no. 12, pp. 1121–8. doi: 10.1089/dna.1996.15.1121.
- Crou, S., Mezitis, S.G., Stieber, A., Gonatas, J.O., and Goud, B. Gonatas NK Immunocytochemical visualization of the Golgi apparatus in several species, including human, and tissues with an antiserum against MG-160, asialoglycoprotein of rat Golgi apparatus, *J. Histochem. Cytochem.*, 1990, vol. 38, no. 7, pp. 957–63. doi: 10.1177/38.7.2355176.
- Planche, A., Bacac, M., and Stamenkovic, I., The Golgi protein GLG1 participates in tumor progression, *Cancer Research.*, 2012, vol. 72, pp. 3245–3245. doi: 10.1158/1538-7445.AM2012-3245.
- Yasmin-Karim, S., King, M.R., Messing, E.M., and Lee1, Y.F., E-selectin ligand-1 controls circulating prostate cancer cell rolling/adhesion and metastasis, *Oncotarget.*, 2014, vol. 5, no. 23, pp. 12097–110. doi: 10.18632/oncotarget.2503.
- Steegmaier, M., Borges, E., Berger, J., Schwarz, H., and Vestweber, D.J., The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface, *Cell Sci.*, 1997, vol. 110, no. 6, pp. 687–94.
- Ahn, J., Febbraio, M., and Silverstein, R.L., A novel isoform of human Golgi complex-localized glycoprotein-1 (also known as E-selectin ligand-1, MG-160 and cysteine-rich fibroblast growth factor receptor) targets differential subcellular localization, *J. Cell Sci.*, 2005, vol. 118, pp. 1725–31. doi: 10.1242/jcs.02310.
- Steegmaier, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., Borges, E., Lenter, M., Kocher, H.P., Kleuser, B., and Vestweber, D., The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor, *Nature*, 1995, vol. 373(6515), pp. 615–20. doi: 10.1038/373615a0.
- Miyaoka, Y., Kato, H., Ebato, K., Saito, S., Miyata, N., Imamura, T., and Miyajima, A., Retention in the Golgi apparatus and expression on the cell surface of Cfr/Esl-1/Glg-1/MG-160 are regulated by two distinct mechanisms, *Biochem. J.*, 2011, vol. 15, no. 440(1), pp. 33–41. doi: 10.1042/BJ20110318.
- Treng, Y.T., Li, W., Chen, C.H., Zhang, S., Chen, J.W., Zhou, X.Z., and Liu, C.C., IIDB: a database for isoform-isoform interactions and isoform network

- modules, *BMC Genomics*, 2015, vol. 16 (Suppl 2), S10. doi: [org/10.1186/1471-2164-16-S2-S10](https://doi.org/10.1186/1471-2164-16-S2-S10).
20. Dunn, K., Kamocka, M., and McDonalс, J., Apractical guide to evaluating colocalization in biological microscopy, *Cell Physiol.*, 2011, vol. 300, no. 4, pp. 723–42. doi: [10.1152/ajpcell.00462.2010](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00462.2010).
21. Zinchuk, V., Zinchuk, O., and Okada, T., Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: Pushing pixels to explore biological phenomena, *Acta Histochem. Cytochem.*, 2007, vol. 40, pp. 101–11. doi: [10.1267/ahc.07002](https://doi.org/10.1267/ahc.07002).
22. McDonald, J., Dunn, K., Statistical tests for measures of colocalization in biological microscopy, *J. Microscopy*, 2013, vol. 255, no. 3, pp. 295–302. doi: [10.1111/jmi.12093](https://doi.org/10.1111/jmi.12093).
23. Wadleigh M., Daniel J. DeAngelo, James D. Griffin and Richard, M., After chronic myelogenous leukemia: tyrosine kinase inhibitors in other hematologic malignancies, *Blood*, 2005, vol. 105, pp. 22–30. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-3896>.
24. Antonenko, S.V., Gurianov, D.S., and Telegeev, G.D., Colocalization of USP1 and PH domain of Bcr-Abl oncoprotein in terms of chronic myeloid leukemia cell rearrangements, *Cytol. Genet.s*, 2016, vol. 50, no. 5, pp 352–6. DOI: [10.3103/s009-5452716050029](https://doi.org/10.3103/s009-5452716050029).
25. Gurianov, D.S., Antonenko, S.V., and Telegeev, G.D., Colocalization of cortactin and PH domain of BCR in HEK293T cells and its potential role in cell signaling, *Biopolym. Cell*, 2016, Vol. 32, no. 1, pp. 26–33. doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000909>.

Надійшла в редакцію 12.07.19
Після доопрацювання 06.09.19
Прийнята до друку 18.01.20