

## КОЛОКАЛІЗАЦІЯ БІЛКА BCR З КЛАТРИНОМ, АКТИНОМ ТА КОРТАКТИНОМ СВІДЧИТЬ ПРО ЙОГО МОЖЛИВУ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦІЇ РОЗГАЛУЖЕННЯ АКТИНУ ТА КЛАТРИН-ОПОСЕРЕДКОВАНОМУ ЕНДОЦИТОЗІ

Д.С. ГУР'ЯНОВ, С.В. АНТОНЕНКО, Г.Д. ТЕЛЕГЕЄВ

Інститут молекулярної біології та генетики НАНУ

E-mail: dmitriy.gurianov@gmail.com

*Філадельфійська хромосома є результатом взаємної транслокації між 9 і 22 хромосомами і є чітким маркером декількох типів мієлопроліферативних розладів. Така транслокація породжує різні типи злиття генів bcr та abl. Ці злиття відрізняються наявністю або відсутністю певних типів доменів BCR та молекулярною масою відповідних химерних білків. BCR-ABLp230 асоціюється з хронічним нейтрофільним лейкозом, BCR-ABLp210 – з хронічним мієлолейкозом, BCR-ABLp190 – з гострим лімфобластним лейкозом. Домен гомології плекстрину BCR присутній у p210 і відсутній у p190 типу злитого білка. У цій роботі ми показали, що білок BCR колокалізується з актином та кортактином на периферії клітин клітин K562. Цей білок також утворював скупчення колокалізації з клатрином та контактином і знаходився в точках розгалуження актину. Це було підтверджено мікроскопією STED із надвисокою роздільною здатністю та звичайною конфокальною мікроскопією живих клітин НЕК 293Т. Конфокальна мікроскопія в реальному часі також виявила відносно велику структуру в цитоплазмі, де спостерігалось динамічне сполучення BCR, клатрину та актину. Це сильно нагадує комплекс Гольджі, оскільки мережа транс-Гольджі є типовим місцем сортування та збирання пухирців, покритих клатрином. Отримані нами дані вказують на те, що BCR в тандемі з кортактином може відігравати важливу роль у динамічних перебудовах актину та мембрани, які впливають на опосередкований клатрином ендоцитоз та везикулярний транспорт Гольджі. Порушення його функції через аномальну активність тирозинкінази ABL може сприяти фенотипу раку.*

**Ключові слова:** BCR-ABL, клатрин-опосередкований ендоцитоз, ХМЛ, кортактин, розгалуження актину.

**Вступ.** Злитий білок BCR-ABL зустрічається у трьох типах – p190, p210 та p230. Вони відрізняються за молекулярною масою через наявність або відсутність певних доменів BCR після транслокації між 9 і 22 хромосомами (Groffen

et al; 1984). Кожен тип корелює з певним мієлопроліферативним розладом. P190 асоціюється з гострим лімфобластним лейкозом (ГЛЛ), p210 – з хронічним мієлолейкозом (ХМЛ), p230 – з хронічним нейтрофільним лейкозом (ХНЛ) (Van Etten 1993; Emilia et al; 1997). Таким чином, дуже важливо вивчити домени BCR, які відсутні у p190 і є в інших двох типах. Ці дані можуть пролити світло на ключовий аспект молекулярного патогенезу BCR-ABL-позитивних мієлопроферативних розладів. Раніше було виявлено 23 потенційних партнера по взаємодії домену гомології Плекстріна (PH) BCR (Miroshnuchenko et al; 2010). Серед цих кандидатів був і кортактин, головна функція якого полягає в реорганізації актину (Chen et al; 2006). Кортактин відіграє активну роль у реорганізації актину під час поділу везикул, покритих клатрином (Zhu et al; 2005). Він розгалужує актин і забезпечує міцну опору для везикули (Cao et al; 2003). Порушення функції кортактину зазвичай призводить до збільшення інвазивності пухлини та зміни адгезії (Weaver; 2008). Передчасне від'єднання попередників клітин крові від строми кісткового мозку є одним із маркерів хронічного мієлолейкозу (Gordon et al; 1988). Ще однією відмінною рисою є проліферація, незалежна від цитокінів (Van Etten; 2007). Клатрин-опосередкований ендоцитоз часто регулює опосередковану рецепторами передачу сигналів (Chen et al; 2017). Таким чином, функція кортактину, змінена внаслідок аномальної активності тирозинкінази BCR-ABL, може впливати на неконтрольовану проліферацію клітин ХМЛ. Раніше було показано, що ABL частина білка BCR-ABL зв'язується з актином своїм актин-зв'язуючим доменом (Underhill-Day et al; 2006). Однак мало відомо про роль частини BCR у реорганізації актину. У цьому дослідженні ми мали на меті визначити,

чи білок BCR колокалізується з актином, клатрином та кортактином та чи відіграє він якусь роль у реорганізації актину.

**Матеріали і методи.** Плазмідні вектори та генетичні конструкції. Vector pmCherry-clathrin – подарунок І. Скрипкіної (ІМБГ НАНУ, Київ, неопубліковані дані). Vector ECFP-Vcr був подарунком від John Groffen & Nora Heisterkamp (плазміда Addgene # 36415; <http://n2t.net/addgene:36415>; RRID: Addgene\_36415) (Cho et al; 2007). EGFP-clatrin Vector був подарунком Т. Грязнової (ІМБГ НАНУ, Київ, неопубліковані дані). Вектор EGFP-PH був створений раніше в нашій лабораторії (Miroshnuchenko et al; 2010). Послідовність CTTN ампліфікували за допомогою рОТВ7-СТТН-вектора з CTTN-F (5'ATGTGGAAAGCTTCAGCAGG) і CTTN-R (5'AGCTCCACATAGTTGGCTGG) і клонували у вектор рBluescriptSKII (+) по сайту EcoRV. Крім того, кодуючу нуклеотидну послідовність кортактину субклоновано в рm-TagRFP-N1 (Майкл Девідсон, Університет штату Флорида) по сайтах BamHI-SallI. Плазмідні були виділені з трансформованої нічної культури клітин *E. coli* NEB Turbo, вирощених на селективному антибіотику методом лужного лізису (Birnboim and Doly; 1979). Для отримання плазмідної ДНК із чистотою, сумісною з трансфекцією, проводили осадженням CaCl<sub>2</sub> з подальшим осадженням NaCl/PEG6000 (Sauer et al; 2008).

**Антитіла та барвники.** Кролячі первинні поліклональні анти-BCR антитіла (Abclonal, AA0068), мишачі первинні моноклональні анти-BCR антитіла (Santa-Cruz Biotechnology, sc-104), кролячі первинні анти-клатрин-НС антитіла (Abclonal, A7886), мишачі первинні анти-кортактин антитіла (Santa-Cruz Biotechnology, sc-55579), кон'юговані Alexa-594 вторинні анти-мишачі антитіла (Thermo Scientific, R37121), вторинні кон'юговані STAR-RED антикролячі антитіла («Abberior», Німеччина), мишачі кон'юговані Alexa-555 вторинні антитіла (Abclonal, AS057) анти-кролячі вторинні кон'юговані Alexa-647 антитіла (Abclonal, AS060), ATTO647N-фалоїдин (Sigma-Aldrich, 65906), FITC-фалоїдин (Sigma-Aldrich, P5282), DAPI (Sigma-Aldrich, D9542), SiR-актин (Spirochrome, SC001).

**Фіксація та фарбування.** Перед фіксацією ростові середовища ретельно відбирали з клі-

тин. Після цього клітини фіксували в 4%-ному параформальдегіді (Sigma-Aldrich, 158127) в PBS впродовж 15 хв при кімнатній температурі. Після фіксації клітини тричі промивали PBS і пермеабілізували в 0,1%-ному Triton X-100 (Serva) в PBS впродовж 10 хв при кімнатній температурі. Далі клітини тричі промивали PBS і блокували 1%-ним бичачим сироватковим альбуміном (Sigma-Aldrich, 05470) у PBS впродовж 1 год при кімнатній температурі. Блокуючий розчин відбирали і відповідний розчин первинних антитіл додавали до клітин і інкубували впродовж ночі при + 4 °С. Після інкубації клітини тричі промивали PBS і додавали відповідний розчин вторинних антитіл та інкубували 1 год при кімнатній температурі. Після інкубації з вторинними антитілами клітини тричі промивали PBS і встановлювали на предметні скельця з твердіючим середовищем Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich, 81381), що містить 2,5 % DABCO (Sigma-Aldrich, D27802) в якості реагента проти вигорання флуорофорів. Клітини були готові до мікроскопії через 24 год після монтування на предметні скельця. Для фіксації та фарбування клітин K562 був використаний модифікований протокол, який передбачає центрифугування для позбавлення від супернатанту.

**Трансфекція та фарбування живих клітин ссавців.** Клітинна лінія HEK293T була використана для візуалізації живих клітин, клітинна лінія K562 та HEK293T – для флуоресцентної мікроскопії фіксованих клітин. Клітини HEK293T вирощували в DMEM з додаванням 5%-ної фетальної бичачої сироватки (FBS) (Biowest, Південна Корея) при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub> і 100 % відносної вологості. Клітини K562 вирощували в RPMI з додаванням 5 % FBS при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub> і 100 % відносної вологості. Перед трансфекцією клітини вирощували до 70 % конфлюентності або 5 · 10<sup>6</sup> клітин. Для рутинних трансфекцій в якості трансфекційного агента застосовували поліетиленімін (PEI) (Sigma-Aldrich, 408727) у співвідношенні 3 : 1 мкг плазмідної ДНК. Коротко, 1 мкг плазмідної ДНК на 106 клітин розводили в 100 мкл середовища росту ссавців без сироватки, відповідний об'єм PEI розводили в іншій пробірці. Вміст обох пробірок перемішували та інкубували впродовж 20 хв при кімнатній температурі. Після інкубації до клітин обережно

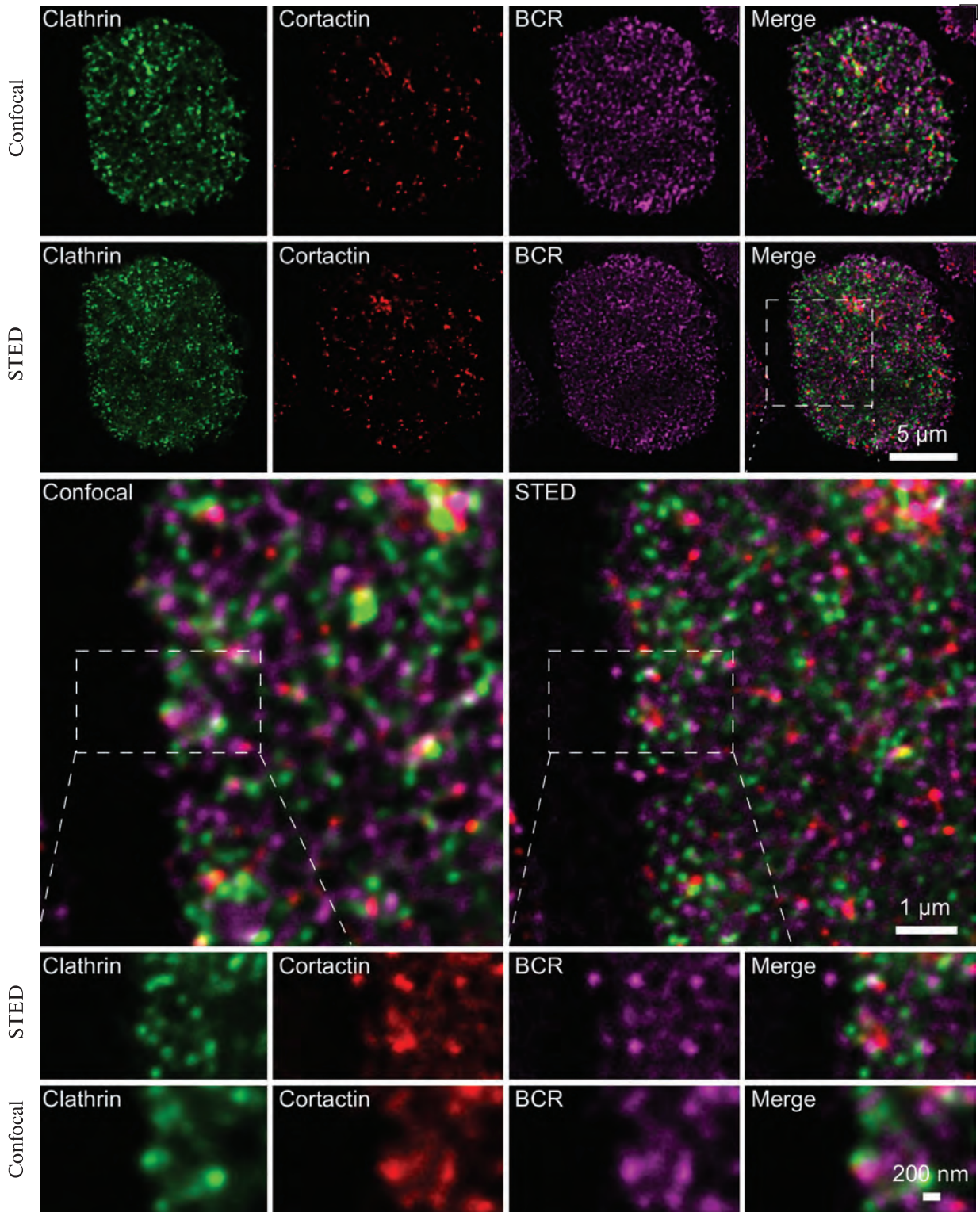
додавали трансфекційну суміш. Для поліпшення ефективності трансфекції клітин K562 ми використовували Turbofect («Fermentas», Литва) як реагент для трансфекції у таких співвідношеннях, як описано для PEI. Протокол трансфекції для Turbofect використовувався відповідно до рекомендацій виробника. Для забарвлення актину в живих клітинах SiR актин додавали до культури клітин за 1 год до візуалізації до кінцевої концентрації 1000 нМоль. DMEM без фенолового червоного та з 20 мМ HEPES використовували для візуалізації живих клітин, щоб уникнути аутофлюоресценції.

**Флуоресцентна мікроскопія.** Флуоресцентна мікроскопія. Мікроскопію з надвисокою роздільною здатністю із стимульованим виснаженням випромінювання (STED – Stimulated emission depletion) проводили на мікроскопі Leica SP8 STED-3D із 100-кратним масляним об'єктивом та 1,4 числовою апертурою. Як для збудження, так і для виснаження був використаний лазер білого світла (WLL). Для збудження EGFP використовували лазерну лінію 488 нм, для Alexa594 та STAR-RED – 564 та 633 нм лазерні лінії. Для виснаження EGFP використовували лазер 594 нм STED. Для одночасного виснаження Alexa594 та STAR-RED використовували лазер 775 нм STED. Для потрібного STED-зображення EGFP-клатрину, Alexa594 та STAR-RED ми використовували послідовний режим сканування лінія за лінією для 5 каналів: EGFP-конфокальний, Alexa594-конфокальний, STAR-RED-конфокальний, Alexa594-STED, STAR-RED-STED. Після отримання зображень з цих 5 каналів та виснаження Alexa594 та STAR-RED, ми провели додаткове сканування каналів EGFP-клатрин-конфокальний та EGFP-клатрин-STED, щоб не зруйнувати Alexa594 та STAR-RED лазером виснаження 594 на початковій стадії. Потужність лазера регулювалася індивідуально, щоб отримати оптимальне відношення сигнал/шум та ефективність STED. Для звичайної конфокальної флуоресцентної мікроскопії та візуалізації живих клітин ми використовували конфокальний мікроскоп Carl Zeiss LSM 510 Meta зі 100-кратним масляним об'єктивом та 1,4 цифровою діафрагмою. Для збудження ECFP ми використовували лазерну лінію 405 нм, для збудження EGFP використовували лазерну лінію 488 нм,

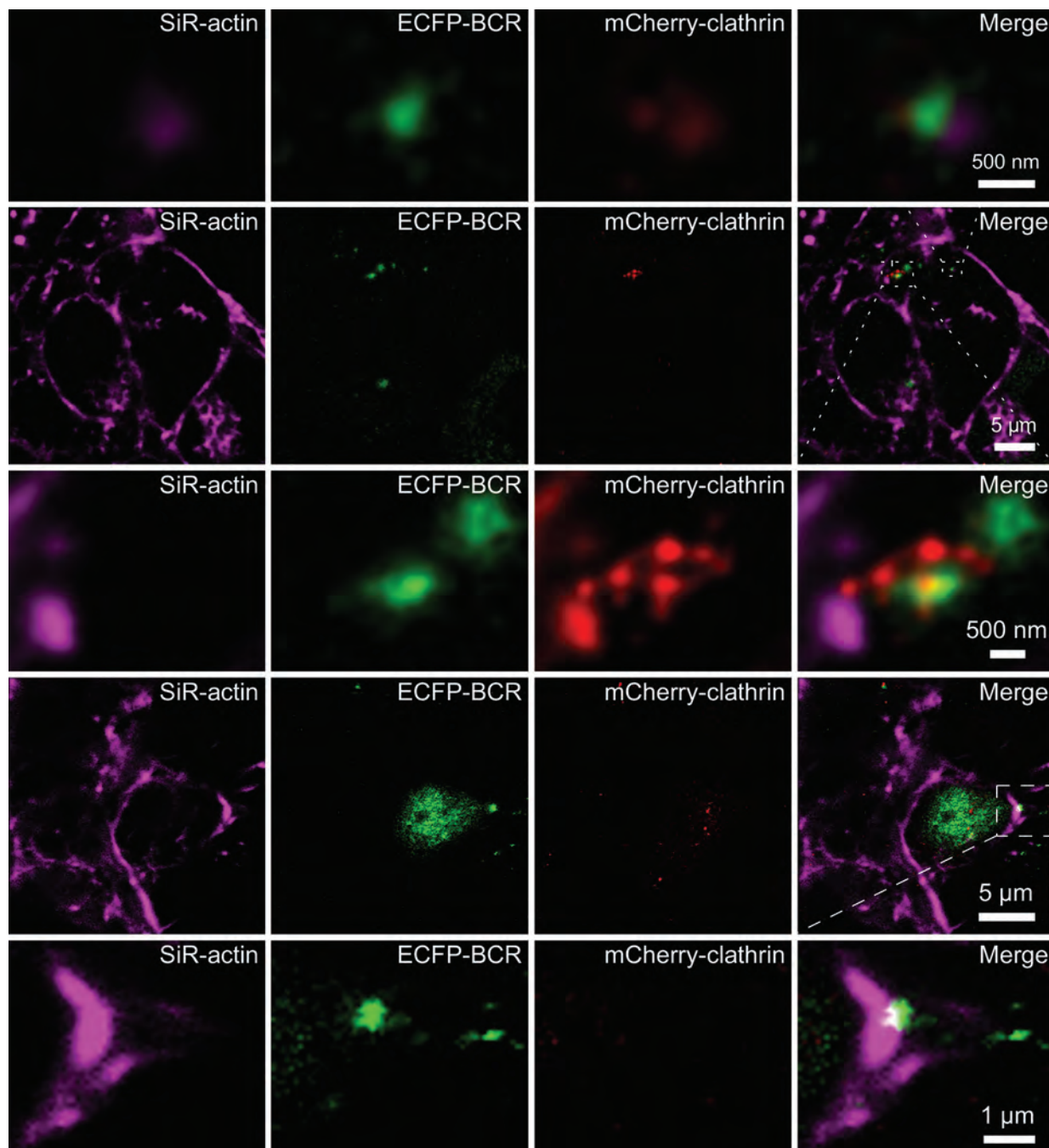
для збудження mCherry та SiR-актину – лазерні лінії 532 та 633 нм відповідно. Послідовний режим лінія за лінією використовувався для живих зображень. Інтенсивність лазера та канали детектування регулювали, щоб уникнути перехресного збудження та спектрального протікання. Ефективний розмір пікселів та вокселів розраховували за критеріями Найквіста (Whittaker 1915; Shannon 1998). Візуалізація живих клітин проводилася при 37 °C і 5 % CO<sub>2</sub> у спеціально розроблених анодованих алюмінієвих предметних слайдах, фрезерованих за допомогою станка з ЧПУ, що містили заглиблення, призначені для покривних скелець розміром 18 × 18 мм. Розміри слайдів співпадають з розмірами скляних предметних скелець та містять прямокутний отвір з заглибленнями. Покривні скельця поміщаються з обох боків у заглиблення, а ростове середовище розміщено між ними. Герметизація покривних скелець відбувається за рахунок харчової силіконової змазки.

**Обробка та аналіз зображень.** Аналіз та обробка зображень здійснювались за допомогою програмного забезпечення Fiji (Schindelin et al; 2012). Аналіз колокалізації проводився в плагіні JaCOP (Bolte and Cordelières; 2006) з використанням коефіцієнтів Мандерса (Manders et al; 1993). Перед аналізом до зображення було застосовано гауссовий фільтр розмиття радіусом 1 піксель. Фоновий сигнал вимірювали за допомогою лінійного профайлера і за необхідності віднімали від зображень. Потім зображення деконволюціонували за допомогою плагіна Deconvolution Lab 2 (Sage et al; 2017) за допомогою алгоритму загальної варіації Річардсон-Люсі (Richardson-Lucy total variation – RLTV) (Dey et al; 2006) з теоретичною функцією розсіювання точки (Point spread function – PSF), згенерованої плагіном PSF Generator (KIRSHNER et al. 2013) за допомогою методу Born and Wolf (Steen; 2000). Кількість ітерацій для деконволюції становила від 5 до 20 і були обрані емпірично для найкращого збереження структури та відсутності артефактів. Генерація остаточного монтажу наборів зображень була здійснена за допомогою плагіна Fiji EzFig (Aigouy and Mirouse; 2013).

**Результати та обговорення.** Різниця у фенотипі мієлопроліферативних розладів, що коре-



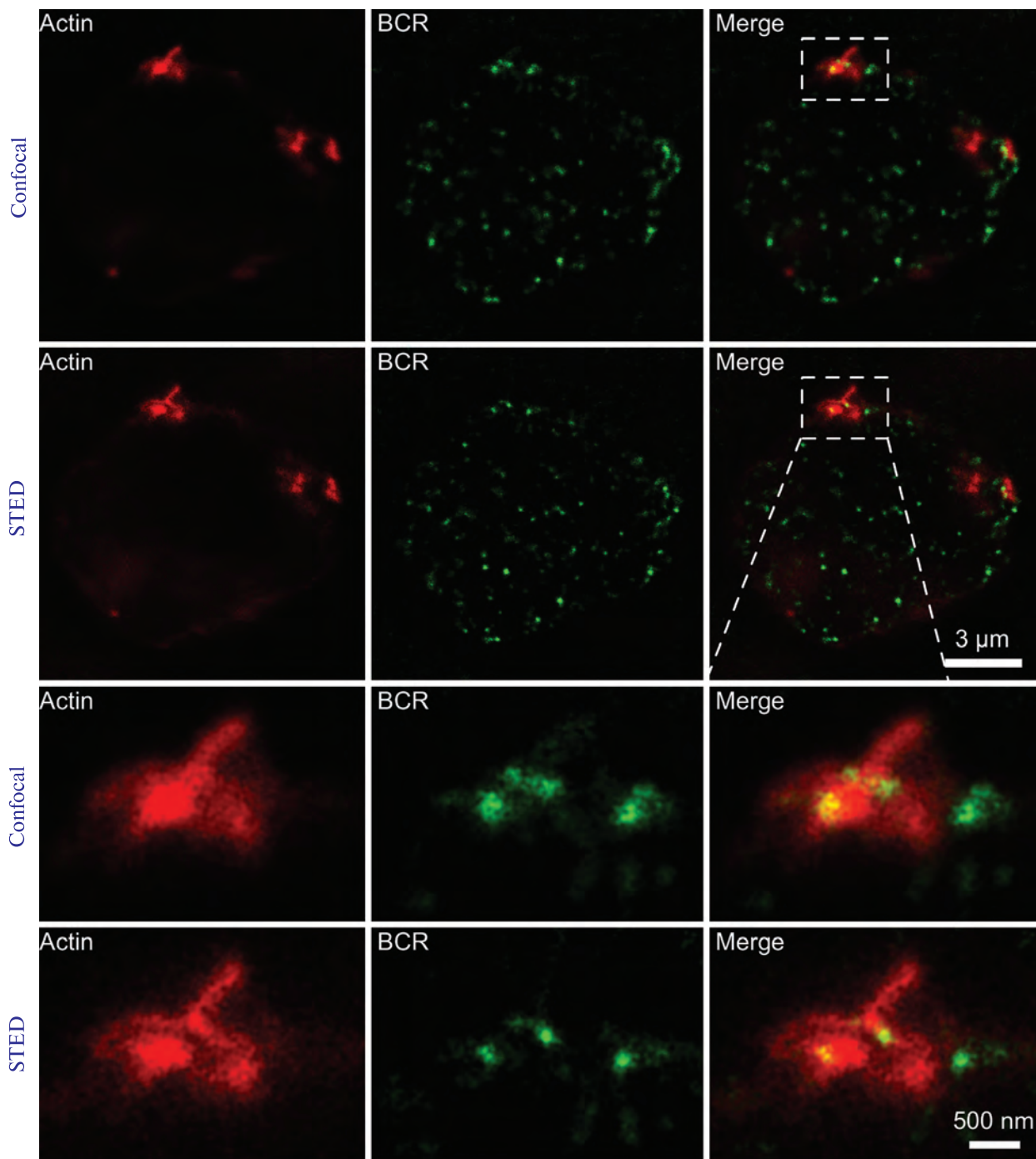
**Рис. 1.** Конфокальні та STED зображення імунофлуоресцентно мічених фіксованих клітин K562, трансфікованих вектором EGFP-clathrin



**Рис. 2.** Флуоресцентна конфокальна мікроскопія живих клітин клітин HEK293Т, забарвлених SiR-актином і трансфікованих mCherry-clathrin та ECFP-BCR

лює з різними формами химерного білка BCR-ABL, робить домен PH важливою мішенню для дослідження його ролі у таких відмінностях. Добре відомою функцією доменів PH є зв'я-

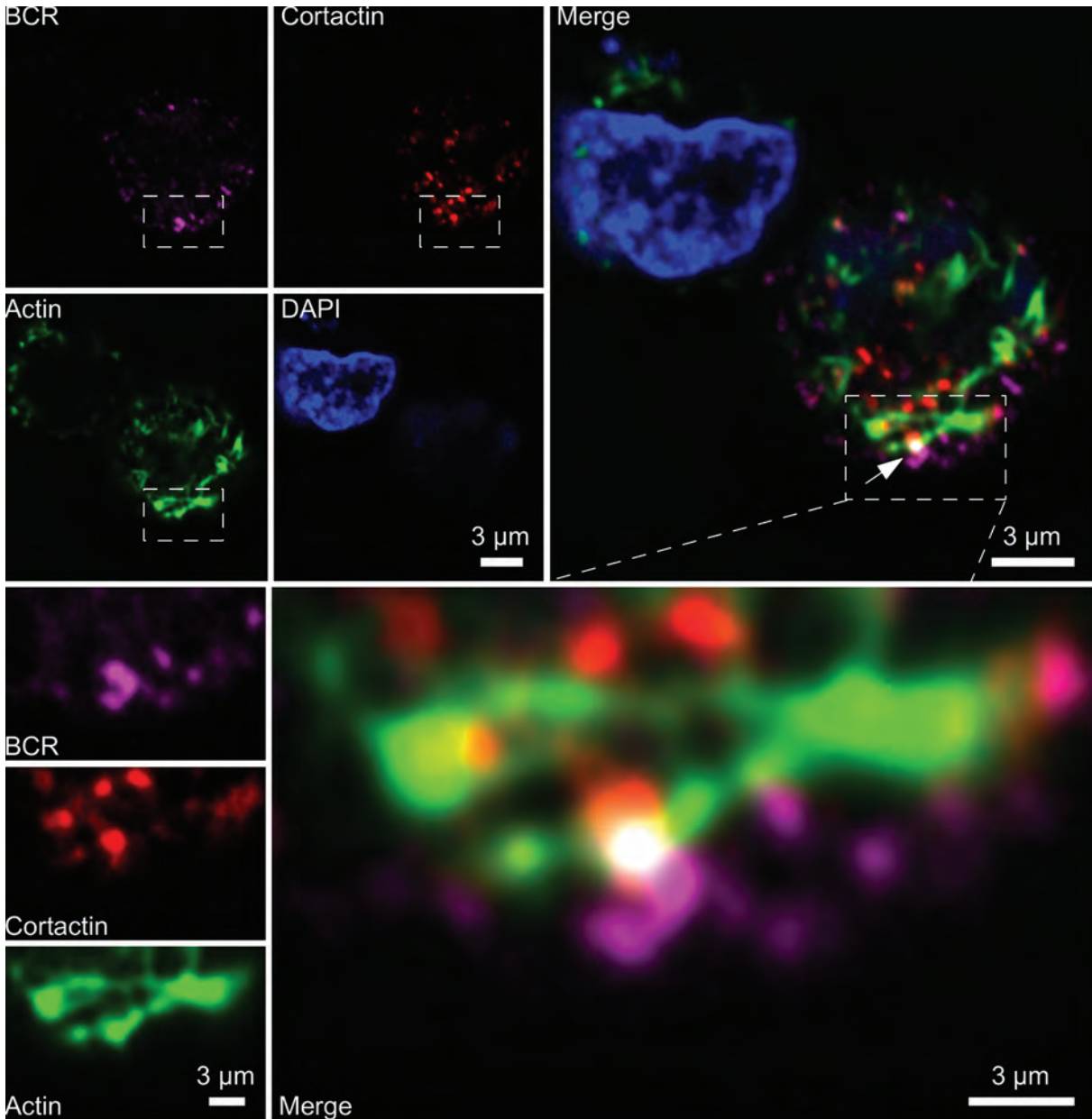
зування фосфоїнозитиду під час мембранно-цитоскелетної реорганізації (Lemmon and Ferguson; 2000). Однак це не єдина функція доменів PH, оскільки вони також важливі для білково-



**Рис. 3.** Конфокальні та STED-зображення фіксованих клітин K562, забарвлених анти-BCR антитілом та фаллоїдином-ATTO647N

білкової взаємодії (Lemmon; 2004). Сам по собі домен PH не має жодної функції сигналізації, подібної до кіназних доменів. З іншого боку,

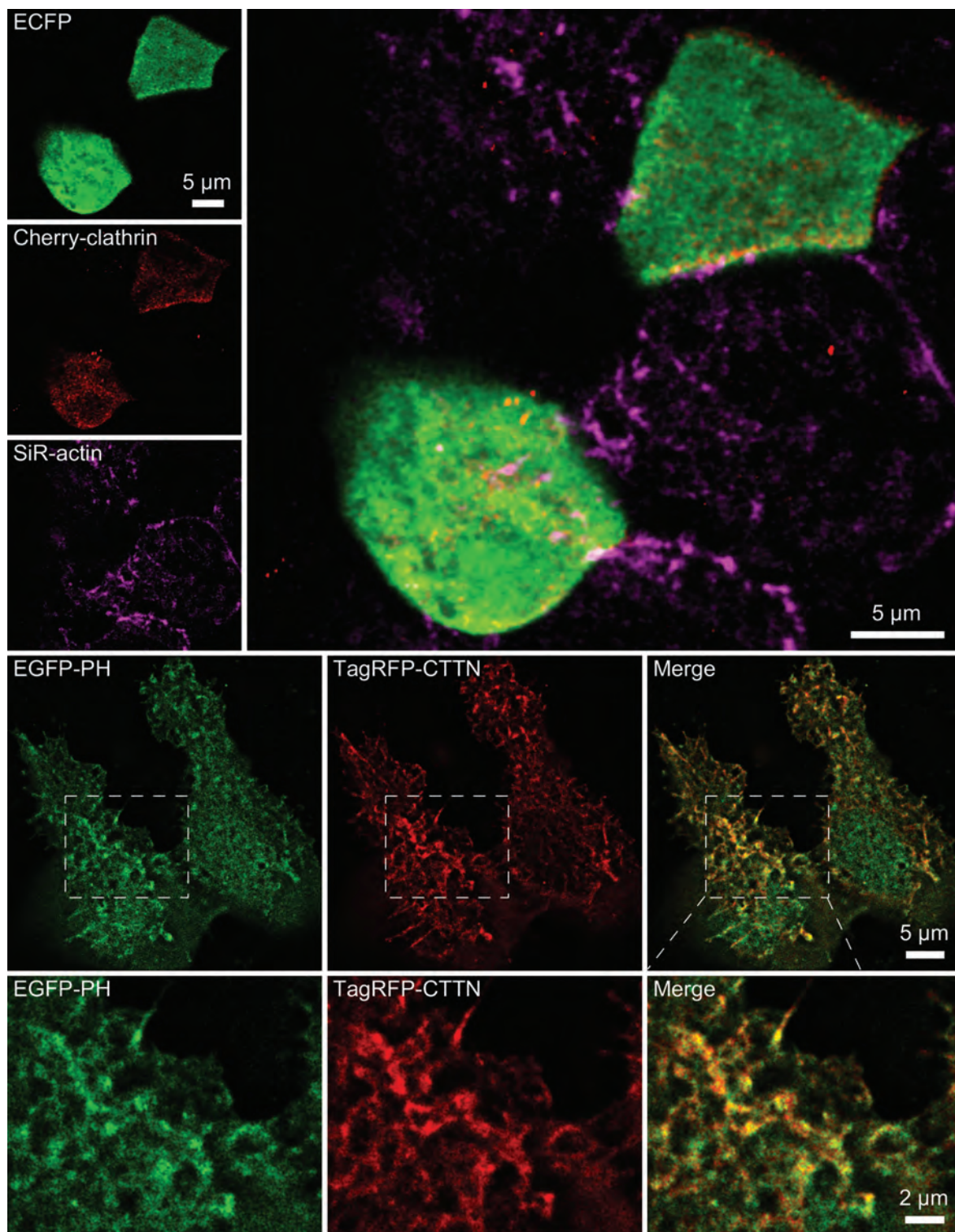
він може забезпечити прив'язку до конкретних клітинних компартментів, які недоступні для білка, в якому відсутній домен PH (Lemmon



**Рис. 4.** Конфокальне зображення фіксованих клітин K562, забарвлених анти-BCR антитілом, анти-CTTN антитілом, фалоїдином-FITC та DAPI

et al; 2002; Yan et al; 2005). Нормальною функцією BCR є контроль полярності клітини (Narayanan et al; 2013). Цей процес вимагає складних перебудов мембрани та цитоскелета. Це може бути забезпечено зв'язуванням RH-домену з кортактином і синхронізацією з його активністю ремодельовання актину. За допомогою мікроскопії надвисокої роздільної здат-

ності STED ми показали, що BCR колокалізується з кортактином та клатриновими везикулами, вказуючи на те, що BCR може відігравати подібну до динамічну роль у інвагінації везикул. Колокалізація в основному відбувається на периферії клітин (рис. 1). Аналіз колокалізації між EGFP-клатрином та імуноміченим кортактином у клітинах K562 (рис. 1)



**Рис. 5.** Конфокальна мікроскопія живих клітин HEK293T, трансфікованих ECFP, Cherry-clathrin та забарвлених SiR-актином, та трансфікованих EGFP-PH та TagRFP-CTTN



показав коефіцієнти Мандерса  $M1 = 0,195$  та  $M2 = 0,545$  для конфокальних зображень, та  $M1 = 0,356$  та  $M2 = 0,542$  для зображень STED. Для EGFP-clathrin та імуноміченого BCR коефіцієнти Мандерса становили  $M1 = 0,71$  та  $M2 = 0,356$  для конфокальних зображень та  $M1 = 0,856$  та  $M2 = 0,57$  для зображень STED. У живих клітинах НЕК293Т ми спостерігали динамічну колокалізацію BCR і актину та BCR і клатрину. Ми також виявили цитоплазматичну структуру при динамічному русі клатрину і BCR (рис. 2). Однак така колокалізація відбувалася не в перимембранному просторі, що характерно для клатрин-опосередкованого ендоцитозу, а скоріше в якомусь внутрішньому клітинному компартменті. Ми припускаємо, що це може бути сортувальний комплекс у комплексі Гольджі. Мережа Транс-Гольджі (TGN) є одним із важливих елементів транспортної системи білків та ендосомних/лізосомних шляхів (Bard and Malhotra; 2006). Везикули, покриті клатрином, утворюються в TGN завдяки скоординованій взаємодії клатрину, адаптерних білків, фосфоінозитів та транспортних білків (Daboussi et al; 2012). Попередня робота показала, що домен PH здатний взаємодіяти з фосфатидин-інозитол-3-фосфатами (PI3P), фосфатидин-інозитол-4-фосфатами (PI4P), фосфатидин-інозитол-5-фосфатами (PI5P) (Migoshnuchenko et al; 2010) і попередником білка 1 апарату Гольджі (GLG1) (Antonenko et al; 2020). PI4P є важливим регулятором функції Гольджі та везикулярного транспорту. BCR та клатрин колокалізувались у точкоподібних структурах протягом короткого періоду часу (рис. 2), що не дивно, враховуючи, що клатрин-опосередкований ендоцитоз є надзвичайно динамічним процесом з циклом менше хвилини. Ми не побачили явної потрібної колокалізації між клатрином, актином та BCR у живих клітинах. Однак ми виявили активну участь BCR у розгалуженні актину (рис. 2). Коефіцієнти Мандерса для ECFP-BCR та mCherry-clathrin становили  $M1 = 0,16$  та  $M2 = 0,118$ , для ECFP-BCR та SiR-актину –  $M1 = 0,211$  та  $M2 = 0,004$ , для mCherry-clathrin та SiR-актину –  $M1 = 0,295$  та  $M2 = 0,021$ . Мікроскопія STED із надвисокою роздільною здатністю фіксованих клітин K562 також показала колокалізацію BCR з точками розгалуження актину і що

діаметр таких точок колокалізації становить приблизно 150 нм (рис. 3). Для імуноміченого кортактину та імуноміченого BCR коефіцієнти Мандерса становили  $M1 = 0,866$  та  $M2 = 0,181$  для конфокальних зображень, та  $M1 = 0,76$  та  $M2 = 0,384$  для зображень STED. Імуномічений BCR колокалізується з актином, міченим фаллоїдином-ATTO647N (рис. 3) з коефіцієнтами Мандерса  $M1 = 0,767$  та  $M2 = 0,545$  для конфокальних зображень та  $M1 = 0,44$  та  $M2 = 0,452$  для STED-зображень. Потрійна колокалізація між BCR, актином та кортактином була виявлена на конфокальному зображенні фіксованих клітинах K562, забарвлених FITC-фаллоїдином та антитілами проти BCR та кортактину (рис. 4). Кортактин і BCR колокалізувались точкоподібно на периферії клітини, а актин розгалужувався від точки їх колокалізації в різні боки. Коефіцієнти Мандерса для колокалізації між BCR та CTTN на конфокальному зображенні фіксованих імуномічених клітин K562 (рис. 4) становить  $M1 = 0,407$  та  $M2 = 0,837$ , для BCR та фаллоїдину-FITC –  $M1 = 0,565$  та  $M2 = 0,676$ , для кортактину та фаллоїдину-FITC –  $M1 = 0,883$  і  $M2 = 0,529$ . Кортактин є добре відомим компонентом, який регулює поглинання везикул, забезпечуючи матрицю розгалуженого актину в тандемі з комплексом Arp2/3 та динаміном (Chen et al; 2006). Цікаво, що динамін також має домен PH, як і білок BCR. Домен гомології плекстрину зустрічається майже у 30 % білків у протеомі людини (Lemmon; 2004). Ми також виявили колокалізацію між доменом PH BCR та кортактином у живих клітинах НЕК293Т на периферії клітини (рис. 5), і їх колокалізація нагадувала нитчасті структури, що, вірогідно, свідчить про участь у розгалуженні кортикального актину. Коефіцієнти Мандерса для EGFP-PH та pmTagRFP-N1-CTTN у живих клітинах НЕК293Т (рис. 5) становили  $M1 = 0,884$  та  $M2 = 0,984$ . Ми не виявили колокалізації між білком ECFP та mCherry-clathrin, а також не спостерігали участі ECFP у розгалуженні актину (рис. 5). Для контрольних зразків коефіцієнти Мандерса між SiR-актином та mCherry-clathrin становили  $M1 = 0,004$  та  $M2 = 0,079$ , між SiR-актином та ECFP –  $M1 = 0,171$  та  $M2 = 0,056$ , між mCherry-clathrin та ECFP –  $M1 = 0,935$  та  $M2 = 0,033$ .

Реорганізація актинових філаментів має вирішальне значення для підтримки початкової фази клатрин-опосередкованого ендцитозу (Yagar et al; 2005; Gu et al; 2010), що є важливим процесом клітинної сигналізації. Його порушення може призвести до змін у проліферації клітин та апоптозі, які спричиняють онкогенну трансформацію (Holst et al; 2017). Підвищена експресія певних РІ4Р-зв'язуючих білків може призвести до порушення секреторних шляхів та розвитку фенотипу раку через зміну рухливості клітин, клітинно-матричної взаємодії та посттрансляційну модифікацію важливих сигнальних білків (Mauringer; 2009; Waugh; 2019). Ці дані разом із нашими спостереженнями можуть свідчити про те, що білок BCR діє як адаптер через взаємодію з РІ4Р та РІ5Р завдяки домену PH. Крім того, ABL частина злитого білка BCR-ABL може мати негативний вплив на цілісність Гольджі, транспорт везикул та транспортні білки через неконтрольоване фосфорилування (Huang and Wang; 2017). Актинова мережа важлива для транспортування та позиціонування комплексу Гольджі, і кортактин також бере участь у цьому процесі (Chen et al; 2004; Cao et al; 2005; Kirkbride et al; 2012). Важливо показати, чи делеція домену PH порушує афінність BCR до кортактину, клатрину та актину та змінює метаболізм PIP. В майбутньому ми плануємо визначити чи впливає фосфорилування кортактину на його колокалізацію з BCR та клатрином, а також чи колокалізується клатрин, актин та BCR з комплексом Гольджі, що дозволить зрозуміти функцію BCR в опосередкованій Гольджі сигналізації та прогресуванні пухлини.

**Дотримання етичних стандартів.** Ця стаття не містить жодних досліджень за участю тварин чи людей, проведених будь-яким із авторів.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Ця робота була підтримана грантом I-Next (ідентифікатор проекту: 8230) в рамках програми Horizon 2020.

COLOCALIZATION OF BCR PROTEIN WITH CLATHRIN, ACTIN, AND CORTACTIN SUGGESTS ITS POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF ACTIN BRANCHING AND CLATHRIN-MEDIATED ENDOCYTOSIS

D.S. Gurianov, S.V. Antonenko, G.D. Telegiev

Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU

E-mail: dmitriy.gurianov@gmail.com

Philadelphia chromosome is a result of reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22 and serves as a distinct marker of several types of myeloproliferative disorders. Such translocation generates different types of fusions of bcr and abl genes. These fusions differ in presence or absence of certain types of BCR domains and in molecular weight of corresponding chimeric proteins. BCR-ABLp230 is associated with chronic neutrophilic leukemia, BCR-ABLp210 – with chronic myelogenous leukemia, BCR-ABLp190 – with acute lymphoblastic leukemia. Pleckstrin homology domain of BCR is present in p210 and absent in p190 type of fusion protein. Mass-spectromic analysis previously identified 23 potential candidates for interaction with PH domain, including cortactin that is responsible for actin branching. In present work we show that BCR protein colocalized with actin and cortactin at K562 cells periphery. It also formed clusters of colocalization with clathrin and cortactin and was located at points of actin branching, which was shown by STED super-resolution microscopy and regular confocal microscopy of live HEK 293T cells. Live confocal microscopy also identified a relatively large structure in cytoplasm where dynamic comovement of BCR, clathrin and actin occurred. This strongly resembles Golgi complex, as trans-Golgi network is a typical location of clathrin-coated vesicle sorting and assembly. Our findings indicate that BCR in tandem with cortactin may have an important role in dynamic actin-membrane rearrangements that affect clathrin-mediated endocytosis and Golgi vesicular transport. The disruption of its function by abnormal tyrosine kinase activity of ABL may promote cancer phenotype.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Aigouy B, Mirouse V (2013) ScientiFig: a tool to build publication-ready scientific figures. *Nat Methods* 10:1048. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2692>
- Antonenko S V., Kravchuk I V., Telegiev GD (2020) Interaction of Bcl-Abl Oncoprotein with the Glg1 Protein in K562 Cells: its Role in the Pathogenesis of Chronic Myeloid Leukemia. *Cytol Genet.* <https://doi.org/10.3103/S0095452720010028>
- Bard F, Malhotra V (2006) The Formation of TGN-to-Plasma-Membrane Transport Carriers. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:439–455. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.133126>
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>

- Bolte S, Cordelières FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224:213–32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>
- Cao H, Orth JD, Chen J, et al (2003) Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis. *Mol Cell Biol* 23:2162–2170. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.6.2162-2170.2003>
- Cao H, Weller S, Orth JD, et al (2005) Actin and Arp1-dependent recruitment of a cortactin-dynamamin complex to the Golgi regulates post-Golgi transport. *Nat Cell Biol* 7:483–92. <https://doi.org/10.1038/ncb1246>
- Chen JL, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, et al (2004) Cytosol-derived proteins are sufficient for Arp2/3 recruitment and ARF/coatomer-dependent actin polymerization on Golgi membranes. *FEBS Lett* 566:281–286. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.061>
- Chen L, Wang Z-W, Zhu J, Zhan X (2006) Roles of cortactin, an actin polymerization mediator, in cell endo-cytosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 38:95–103. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2006.00141.x>
- Chen PH, Yao H, Huang LJS (2017) Cytokine receptor endocytosis: New kinase activity-dependent and -independent roles of PI3K. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8: <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00078>
- Cho YJ, Cunnick JM, Yi S-J, et al (2007) Abr and Bcr, Two Homologous Rac GTPase-Activating Proteins, Control Multiple Cellular Functions of Murine Macrophages. *Mol Cell Biol* 27:899–911. <https://doi.org/10.1128/mcb.00756-06>
- Daboussi L, Costaguta G, Payne GS (2012) Phosphoinositide-mediated clathrin adaptor progression at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* 14:239–248. <https://doi.org/10.1038/ncb2427>
- Dey N, Blanc-Feraud L, Zimmer C, et al (2006) Richardson-Lucy algorithm with total variation regularization for 3D confocal microscope deconvolution. *Microsc Res Tech* 69:260–6. <https://doi.org/10.1002/jemt.20294>
- Emilia G, Luppi M, Marasca R, Torelli G (1997) Relationship between BCR/ABL Fusion Proteins and Leukemia Phenotype. *Blood* 89:3889–3889. [https://doi.org/10.1182/blood.V89.10.3889.3889\\_3889\\_3889](https://doi.org/10.1182/blood.V89.10.3889.3889_3889_3889)
- Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, et al (1988) Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* 328:342–344. <https://doi.org/10.1038/328342a0>
- Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, et al (1984) Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 36:93–99. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90077-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90077-1)
- Gu C, Yaddanapudi S, Weins A, et al (2010) Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J* 29:3593–606. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.249>
- Holst MR, Vidal-Quadras M, Larsson E, et al (2017) Clathrin-Independent Endocytosis Suppresses Cancer Cell Blebbing and Invasion. *Cell Rep* 20:1893–1905. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.006>
- Huang S, Wang Y (2017) Golgi structure formation, function, and post-translational modifications in mammalian cells. *F1000Research* 6:2050. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11900.1>
- Kirkbride KC, Hong NH, French CL, et al (2012) Regulation of late endosomal/lysosomal maturation and trafficking by cortactin affects Golgi morphology. *Cytoskeleton* 69:625–643. <https://doi.org/10.1002/cm.21051>
- Kirshner H, Aguet F, Sage D, Unser M (2013) 3-D PSF fitting for fluorescence microscopy: implementation and localization application. *J Microsc* 249:13–25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2012.03675.x>
- Lemmon MA (2004) Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. *Biochem Soc Trans* 32:707–711. <https://doi.org/10.1042/BST0320707>
- Lemmon MA, Ferguson KM (2000) Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* 350:1. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3500001>
- Lemmon MA, Ferguson KM, Abrams CS (2002) Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS Lett* 513:71–76
- Manders EMM, Verbeek FJ, Aten JA (1993) Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc* 169:375–382. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313.x>
- Mayinger P (2009) Regulation of Golgi function via phosphoinositide lipids. *Semin Cell Dev Biol* 20:793–800. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2009.03.016>
- Miroshnychenko D, Dubrovskaya A, Maliuta S, et al (2010) Novel role of pleckstrin homology domain of the Bcr-Abl protein: analysis of protein-protein and protein-lipid interactions. *Exp Cell Res* 316:530–42. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.11.014>
- Narayanan AS, Reyes SB, Um K, et al (2013) The Rac-GAP Bcr is a novel regulator of the Par complex that controls cell polarity. *Mol Biol Cell* 24:3857–3868. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-06-0333>
- Sage D, Donati L, Soulez F, et al (2017) DeconvolutionLab2: An open-source software for deconvolution microscopy. *Methods* 115:28–41. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.12.015>

- Sauer M-L, Kollars B, Geraets R, Sutton F (2008) Sequential CaCl<sub>2</sub>, polyethylene glycol precipitation for RNase-free plasmid DNA isolation. *Anal Biochem* 380:310–314. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.05.044>
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al (2012) Fiji: an open source platform for biological image analysis. *Nat Methods* 9:676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.Fiji>
- Shannon CE (1998) Communication In The Presence Of Noise. *Proc IEEE* 86:447–457. <https://doi.org/10.1109/JPROC.1998.659497>
- Steen W. (2000) Principles of Optics M. Born and E. Wolf, 7th (expanded) edition, Cambridge University Press, Cambridge, 1999, 952pp. 37.50/US \$59.95, ISBN 0-521-64222-1. *Opt Laser Technol* 32:385. [https://doi.org/10.1016/S0030-3992\(00\)00061-X](https://doi.org/10.1016/S0030-3992(00)00061-X)
- Underhill-Day N, Pierce A, Thompson SE, et al (2006) Role of the C-terminal actin binding domain in BCR/ABL-mediated survival and drug resistance. *Br J Haematol* 132:774–783. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05949.x>
- Van Etten RA (2007) Aberrant cytokine signaling in leukemia. *Oncogene* 26:6738–6749. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210758>
- Van Etten RA (1993) The molecular pathogenesis of the philadelphia-positive leukemias: Implications for diagnosis and therapy. In: *Cancer treatment and research*. Cancer Treat Res, pp 295–325
- Waugh MG (2019) The Great Escape: how phosphatidylinositol 4-kinases and PI4P promote vesicle exit from the Golgi (and drive cancer). *Biochem J* 476:2321–2346. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180622>
- Weaver AM (2008) Cortactin in tumor invasiveness. *Cancer Lett* 265:157–66. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.066>
- Whittaker ET (1915) XVIII. — On the Functions which are represented by the Expansions of the Interpolation-Theory. *Proc R Soc Edinburgh* 35:181–194. <https://doi.org/10.1017/S0370164600017806>
- Yan J, Wen W, Xu W, et al (2005) Structure of the split PH domain and distinct lipid-binding properties of the PH-PDZ supramodule of alpha-syntrophin. *EMBO J* 24:3985–3995. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600858>
- Yarar D, Waterman-Storer CM, Schmid SL (2005) A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* 16:964–975. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-09-0774>
- Zhu J, Zhou K, Hao J-J, et al (2005) Regulation of cortactin/dynamin interaction by actin polymerization during the fission of clathrin-coated pits. *J Cell Sci* 118:807–17. <https://doi.org/10.1242/jcs.01668>

Надійшла в редакцію 19.11.20  
Після доопрацювання 10.12. 20  
Прийнята до друку 18.03.21