

ОКРЕМІ ФУНКЦІЇ PH ДОМЕНУ P210 ІЗОФОРМИ BCR/ABL: ВЗАЄМОДІЯ З БІЛКАМИ РЕМОДЕЛЮВАННЯ ЦИТОСКЕЛЕТУ ТА МЕМБРАН

Д.С. ГУР'ЯНОВ, І.В. КРАВЧУК, С.В. АНТОНЕНКО,
М.Г. ТЕСЛЮК, М.В. ДИБКОВ, Г.Д. ТЕЛЕГЕЄВ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Академіка Заболотного 150, Київ, 03143, Україна

E-mail: dmitriy.gurianov@gmail.com

Автор для кореспонденції – Д.С. Гур'янов, e-mail: dmitriy.gurianov@gmail.com

Злитий білок BCR/ABL, утворений транслокацією філадельфійської хромосоми, викликає хронічний мієлолейкоз (ХМЛ) та інші мієлопроліферативні захворювання. Ізоформа p210 включає домен гомології плекстрину (PH), відсутній в ізоформі p190, яка в свою чергу пов'язана з гострим лімфобластним лейкозом (ALL). Ця структурна відмінність може лежати в основі відмінної субклітинної локалізації та сигнальних профілів двох ізоформ. В цій роботі ми досліджуємо роль домену PH білка BCR у взаємодії з кортактином і FBP17, білками, що беруть участь у ремоделюванні цитоскелета та динаміці мембран. Використовуючи GST-пулдаун і вестерн-блот, ми продемонстрували пряму взаємодію домена PH білка BCR як з кортактином, так і з FBP17. Дослідження колокалізації, підтверджені конфокальною та STED-мікроскопією, показали, що кортактин спільно локалізується з PH-доменом BCR у центросомальних та перимембранних областях клітин. Примітно, що окремий домен SH3 кортактину не був необхідним для цієї взаємодії, що свідчить про те, що інші домени опосередковують зв'язування. Ці висновки підкреслюють роль домену PH у спрямуванні BCR/ABL до центросоми, де він взаємодіє з кортактином, потенційно впливаючи на динаміку актину та везикулярний транспорт. Ця центросомальна локалізація може просторово обмежувати активність конститутивної тирозинкінази ABL, сприяючи менш агресивному фенотипу p210-асоційованої ХМЛ порівняно з p190-керованим ГЛЛ. Розуміння ролі домену PH як ключової структурної відмінності між p210 і p190 має вирішальне значення для з'ясування молекулярної основи BCR/ABL-опосередкованого лейкемогенезу. У майбутніх дослідженнях буде досліджено фосфорилування кортактину та FBP17 ABL-кіназою та домени, відповідальні за ці взаємодії.

Ключові слова: BCR/ABL, кортактин, FBP17, PH домен, ХМЛ, GST-пулдаун, білок-білкові взаємодії.

Вступ. Злитий білок BCR/ABL є ознакою кількох мієлопроліферативних розладів, що

виникають внаслідок транслокації t(9;22), що призводить до утворення філадельфійської хромосоми (Hecht et al, 1985). Це злиття може створити різні ізоформи онкопротеїну, насамперед p190, p210 і p230, які відрізняються залежно від точки розриву в гені BCR. Ізоформа p190 найчастіше асоціюється з В-клітинним гострим лімфобластним лейкозом (В-ГЛЛ), що відображає його сильну онкогенну активність у лімфоїдних попередниках. Ізоформа p210 є найбільш поширеною при хронічній мієлолейкемії (ХМЛ), спричиняючи захворювання через аномальну активність тирозинкінази та deregulовані сигнальні шляхи, які впливають на проліферацію та виживання гемопоетичних стовбурових клітин. Ізоформа p230, що характеризується довшим фрагментом BCR, пов'язана з більш рідкісною, менш агресивною формою хронічного нейтрофільного лейкозу (ХНЛ) із порівняно зниженою активністю кінази. Ці ізоформи не тільки визначають фенотип захворювання, але й впливають на реакцію на таргетну терапію, що робить їх вивчення критичним для розуміння механізмів захворювання та покращення стратегій лікування (Emilia et al, 1997). Ізоформи p190 і p210 злитого білка BCR/ABL значно відрізняються за своїм структурним складом через варіації точки розриву в гені BCR. Ізоформа p190 є результатом розриву в мінорній кластерній ділянці (m-BCR) гена BCR. Він зберігає спіральний (coiled-coil) домен BCR, який є важливим для димеризації та конститутивної активації ABL-кінази. Однак у ньому відсутні центральні домени BCR, такі як домен гомологічний DBL (DH), домен гомологічний плекстрину (PH) і домен фактора заміни гуанінового нуклеотиду Rho (RhoGEF), які присутні в ізоформі p210. Ізоформа p210 є результатом розриву в основній кластерній області (M-

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2025

BCR) гена BCR (Ben-Neriah et al, 1986). Ці додаткові домени залучені до організації цитоскелета та сигнальних шляхів, які сприяють ширшому потенціалу онкогенної та клітинної трансформації p210, порівняно з p190. Ці структурні відмінності мають функціональні наслідки. Додаткові домени в p210 посилюють його взаємодію з різними клітинними сигнальними шляхами, що призводить до відмінних від p190 наслідків (Quintás-Cardama and Cortes, 2009). Отже, p210 в основному асоціюється з хронічним мієлолейкозом (ХМЛ), тоді як p190 більш поширений при гострому лімфобластному лейкозі (ГЛЛ), що відображає відмінності у фенотипі та прогресуванні захворювання (Emilia et al, 1997; Telegeev et al, 2004).

Домен гомологічний плекстрину (РН) білка BCR є багатфункціональним модулем, залученим до клітинного сигналіну та цитоскелетної регуляції. Хоча конкретні деталі про роль РН-домену BCR повністю не з'ясовані, домени РН загалом відомі своєю здатністю зв'язувати фосфоінозитиди в плазматичній мембрані, сприяючи мембранній асоціації та рекрутуванню білків у специфічні субклітинні компартменти (Hirata et al, 1998; Lemmon, 2010). Домени РН зустрічаються в широкому спектрі білків і зазвичай функціонують як модулі зв'язування ліпідів. Вони часто зв'язуються з фосфоінозитидами, такими як фосфатидилінозитол 3,4,5-трифосфат (PIP3) або фосфатидилінозитол 4,5-бісфосфат (PIP2), причому специфічність різна для різних білків (Lemmon and Ferguson, 2001). Це зв'язування опосередковує локалізацію білків на мембранах і полегшує їх роль у сигнальних шляхах (Lenoir et al, 2015). Наприклад, домен РН Akt зв'язує PIP3, націлюючи кіназу на плазматичну мембрану для активації локальних кіназ (Thomas et al, 2002). Домен РН GRB2-асоційованого зв'язувального білка (GAB1) опосередковує рекрутинг мембрани протягом сигналіну факторів росту (Maroun et al, 1999, 2003). Домен РН динаміну допомагає задавати кривизну мембрани під час транспортування везикул (Gu et al, 2010; Itoh et al, 2005; Krueger et al, 2003). Недавні дослідження продемонстрували участь домену РН BCR у білок-білкових і білково-ліпідних взаємодіях, які є вирішальними для онкогенної активності BCR/ABL

(Gregor et al, 2019; Reckel et al, 2017). Наприклад, домен РН зв'язує фосфоінозитиди, такі як PIP2 і PIP3, що сприяє локалізації на мембрані та рекрутуванню сигнальних комплексів (Miroshnichenko et al, 2010). Ця функція узгоджується із загальною роллю доменів РН в інших білках, де вони опосередковують взаємодію з ліпідами та сприяють клітинній локалізації та шляхам передачі сигналу, таким як ті, що спостерігаються в Akt сигнальному шляху та транспортуванні везикул. Протеомні дослідження з використанням клітинних ліній лейкемії (наприклад, K562) ідентифікували 23 білка, які потенційно зв'язуються з доменом РН BCR, підкреслюючи його ширшу мережу взаємодій та функціональні наслідки в сигнальних каскадах, критичних для прогресування лейкемії (Miroshnichenko et al, 2010). Серед цих ідентифікованих партнерів були кортактин, регулятор ремоделювання цитоскелету актину, і FBP17, білок, який бере участь у викривленні мембрани та транспортуванні везикул. Ці результати підкреслюють участь домену РН BCR у шляхах, пов'язаних із динамікою цитоскелета та процесами, пов'язаними з мембраною.

Кортактин — це цитоскелетний білок, який головним чином бере участь у регуляції актинових ниток (Wu & Parsons, 1993). Він посилює стоврення та розгалуження актинових ниток шляхом взаємодії з комплексом Arp2/3, критичним регулятором полімеризації актину (Krueger et al, 2003; Weed and Parsons, 2001). Цей білок відіграє важливу роль у різних клітинних процесах, включаючи клітинну рухливість, де він сприяє утворенню ламеліподій та інвадоподій, структур, важливих для клітинної міграції та інвазії (Cosen-Binker and Karus, 2006; Schnoor et al, 2018). Крім того, кортактин бере участь у ендоцитозі, опосередкованому клатрином, шляхом стабілізації актинових ниток у ендоцитозних пухирцях, і він пов'язує динаміку цитоскелета з внутрішньоклітинними сигнальними шляхами через взаємодію з кількома сигнальними молекулами (Zhu et al, 2005). Важливо, що надмірна експресія кортактину була пов'язана з посиленням метастатичного потенціалу при різних видах раку, підкреслюючи його роль у розвитку раку (Buday and Downward, 2007; Jeannot and Besson, 2020; Weaver, 2008).

FBP17 (формін-зв'язувальний білок 17) — це білок, що містить VAR-домен, критичний для викривлення мембрани та утворення ендоцитних везикул. Він відіграє важливу роль у ремоделюванні мембран, індуюючи трубчасті мембранні структури шляхом зв'язування з вигнутими мембранами, сприяючи таким процесам, як ендоцитоз і транспортування везикул (Snider et al, 2021). FBP17 також координує ріст актинової нитки з ремоделюванням мембрани, взаємодіючи з WASP (білком синдрому Віскотта-Олдріча), щоб рекрутувати та активувати комплекс Arp2/3 (Li et al, 2023). Крім того, він бере участь у сигнальних шляхах, які регулюють організацію цитоскелета, впливаючи на морфологію та поділ клітин (Tsujita et al, 2006). У контексті розвитку нейронів FBP17 бере участь у формуванні дендритних шипів і синаптичній пластичності через його взаємодію з білками, що регулюють актин (Taylor KL et al, 2019).

Разом ці функції підкреслюють потенційну важливість взаємодії кортактину та FBP17 з РН-доменом BCR. Ці взаємодії, ймовірно, сприяють шляхам, що регулюють динаміку цитоскелета, транспортування везикул і клітинний сигналінг, що має наслідки для розуміння їхньої ролі в патологічних контекстах, таких як хронічний мієлолейкоз.

В попередніх протеомних дослідженнях, використовували мас-спектрометрію для ідентифікації потенційних партнерів взаємодії домену РН (Miroshnychenko et al, 2010), важливо підтвердити ці дані більш надійними методами, оскільки мас-спектрометрія також може виявляти непрямі взаємодії та давати хибнопозитивні результати (Yugandhar et al, 2019). Метою цього дослідження було вивчення того, чи існує пряма взаємодія між FBP17 і РН-доменом BCR, а також між кортактином і РН-доменом BCR. Крім того, ми прагнули визначити, чи SH3-домен кортактину, який зазвичай бере участь у білково-білкових взаємодіях, відіграє вирішальну роль у взаємодії між кортактином та РН-доменом BCR. Щоб доповнити ці результати, ми також вивчали внутрішньоклітинну локалізацію кортактину, повнорозмірного BCR та окремо РН-домену білка BCR за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Цей комплексний підхід дає критичне уявлення про

молекулярні механізми та клітинний контекст цих взаємодій, поглибивши наше розуміння їх ролі в патології хронічного мієлоїдного лейкозу.

Матеріали та методи. *Вектори та плазміди.* Послідовність, що кодує кортактин, ампліфікували методом ПЛР з використанням олігонуклеотидів CTTN-F (5'-tataagaattcAGATGTGGAAAGCTTCAGCAG) і CTTN-R (5'-tatagatccAAAGAAGGCCTGATCTGTAGTG) і pOTB7-CTTN (люб'язний подарунок проф. А. Дубровської) як матрицю. Умови ПЛР були: цикл денатурації — 15 с при 93 °С; цикл відпау — 30 с при 60 °С; цикл подовження — 90 с при 72 °С; 30 циклів загалом і 2 хв кінцевої добуdivи при 72 °С). Ампліфікований ПЛР-фрагмент очищали з агарозного гелю на саморобних колонках, заповнених 8-шаровими фільтрами зі скловолокна GF/C (Whatman), використовуючи гуанідинтіюанат як зв'язувальний агент відповідно до стандартного протоколу (Dowhan, 2008). Очищений фрагмент ДНК вставляли у вектор pBluescriptSKII+ лігуванням по тупим кінцям у сайт EcoRV з використанням ДНК-лігази Т4 відповідно до рекомендацій виробника (5 одиниць ДНК-лігази Т4 у буфері для реакції лігази від виробника, і загальний об'єм реакції 20 мкл впродовж 16 годин при +20 °С з молярним співвідношенням вставки до вектора 3 : 1 і загальною концентрацією 200 нг ДНК у реакції лігування). Продукт реакції лігування трансформували в хімічно підготовлені компетентні клітини E. coli TOP10 за допомогою методу теплового шоку та висівали на чашки з поживним агаром із селективними антибіотиками з подальшою інкубацією при +37 °С впродовж 18 год (Froger and Hall, 2007). Індивідуальні колонії використовували для виділення плазміди та ідентифікації клонів, що містять правильну вставку. Отриману конструкцію pBLSK-CTTN використовували як матрицю для подальшого субклонування. Зокрема, послідовність, що кодує CTTN, була субклонована сайтами BamHI та NotI у вектор pGEX4T2. FBP17-pmCherryC1 є дарунком Крістієна Мерріфілда (Christien Merrifield) (плазміда Addgene #27688; <http://n2t.net/addgene:27688>; RRID: Addgene 27688) (Taylor MJ et al, 2011). Послідовність, що кодує FBP17, вирізали з mCherry-FBP17 за допомогою сайтів ендонуклеази рес-

трикції BglII і EcoRI і субклонували у вектор pGEX4T-1 за допомогою сайтів BamHI і EcoRI. Умови реакції лігування були ідентичними описаним раніше в тексті для фрагмента ПЛР кортактину та вектора BluescriptSKII+. Генетична конструкція для експресії pGEX з GST-міченим доменом SH3 кортактину була щедрим подарунком від Сергія Кропивка (ІМБГ, Київ, Україна). Експресійна конструкція pET28c-PH з міченим полігістидином PH доменом BCR була створена в попередній роботі (Miroshnychenko et al, 2010).

Виділення плазмід. Виділення плазмід в масштабі середніх кількостей (midiprep) проводили методом лужного лізису (Birnboim and Doly, 1979). Виділення плазмід у мінімальних кількостях (miniprep) проводили методом з використанням неіонного детергенту (Lezin et al, 2011). Чистота та кількість виділеної плазмідної ДНК оцінювали за допомогою агарозного гелю електрофорезу та спектрофотометричними вимірами на спектрофотометрі Nanodrop 2000 UV-vis (Thermo Fisher).

Реагенти та матеріали. Pfu ДНК полімераза, T4 ДНК лігаза, ендонуклеази рестрикції EcoRV, EcoRI, BamHI, BglII, NotI (Thermo Fisher). Антитіла до полігістидину (Sigma Aldrich). Гуллатіон сефароза 4B (Glutathione Sepharose 4B) (Pharmacia). His-select Nickel affinity gel (Sigma Aldrich), імідазол (Sigma Aldrich), Triton X-100, NaCl, Tryptone, Дріжджовий екстракт, сахароза, EDTA, акриламід, бісакриламід, TEMED, бетамеркаптоетанол, додецил сульфат натрію (SDS), luminol, coumaric acid, перекис водню, калій оцтовокислий, NaOH, ізопропанол, етанол, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NH₄Cl, персульфат амонію, KCl, PMSF, лізоцим, G-кумасі 250, бромфеноловий синій, Tris Base (CHEMLABORREAKTIV, Ukraine).

Розщеплення ДНК ендонуклеазами. Для кожної реакції розщеплення ендонуклеазою рестрикції використовували 5 одиниць ендонуклеази рестрикції, 1 мкг плазмідної ДНК, загальний реакційний об'єм 20 мкл. Буфер підбирали для оптимальної активності кожної ендонуклеази відповідно до рекомендацій виробника (Thermo Fisher). Типовими умовами реакції є 37 °C впродовж 1 год з подальшою термічною інактивацією при 80 °C впродовж 20 хв.

Експресія білків та їх очищення. Плазмідні трансформували в хімічно підготовлені компетентні клітини E. coli BL21 Rosetta за допомогою методу теплового шоку (Froger and Hall, 2007) та висівали на чашки з поживним агаром із 100 мкг/мл ампіциліном та 25 мкг/мл хлорамфеніколом в якості селективних антибіотиків. Чашки з поживним агаром потім інкубували при +37°C впродовж 18 год. Індивідуальні колонії відбирали та інокулювали в 5 мл ZYM-505 поживне середовище (Studier, 2005) з 100 мкг/мл ампіциліном та 25 мкг/мл хлорамфеніколом в якості селективних антибіотиків та інкубували при перемішуванні на 200 обертах на хвилину (rpm) при +37 °C впродовж 18 год. На наступний день 0,2 мл стративої культури інокулювали в 100 мл в ZYM-5052 середовище для автоіндукції (Studier, 2005) інкубували при перемішуванні на 200 обертах на хвилину (rpm) при +37 °C до досягнення оптичної густини OD₆₀₀, що дорівнювало 0,4–0,5. Після цього температуру знижували до 20–22 °C і продовжували інкубацію наступні 18–24 годин. Невелику кількість (~200 мкл) культури відбирали до та після індукції та кип'ятили впродовж 5 хв в 4× буфері для завантаження для порівняння експресії білків в поліакриламідному гелю електрофорезу (PAGE). Клітини бактерій збирали центрифугуванням при 2000 g впродовж 20 хв. Клітинний осад перемішували та ресуспендували в 10 мл холодного PBS, що містить 1 mM PMSF в якості інгібітора протеази та 100 мкг/мл лізоциму. Лізат інкубували на льоду впродовж 30 хв з подальшим ультразвуковим руйнуванням (звичай 10-секундний імпульс, а потім 10-секундний період паузи, це повторювали 6 разів). Лізовані клітини центрифугували при 16000 g впродовж 20 хв при +4 °C. Супернатант збирали в нову пробірку. Частину зразка відбирали та кип'ятили в 4× буфері для завантаження для подальшого аналізу білків, що містяться в розчинній фракції лізату. Подальша афінна очистка відрізняється для білків, мічених his та GST. Мічений полігістидином домен PH очищали на колонці, наповненій афінним гелем з нікелем His-select, і врівноважували PBS. Коротко, 200 мкл нікелевої афінної смоли заповнювали в 8 мл гра-

вітаційну колонку і кілька разів промивали PBS. Просвітлений лізат, що містить рекомбінантний домен РН BCR, наносили на колонку та пропускали через неї під дією сили тяжіння. Далі 10 об'ємів колонки промивного буфера (PBS, що містить 10 мМ імідазолу) використовували для промивання колонки від неспецифічного зв'язування ендогенних білків *E. coli*. Після цього зв'язаний домен РН елюювався 3 об'ємами колонки буфера для елюції (PBS, що містить 300 мМ імідазолу) і збирався в нову пробірку. Елюат знесолювали проти буфера PBS за допомогою знесолювальної колонки PD-10 згідно з інструкціями виробника. Концентрацію та чистоту елюйованого та знесоленого білка визначали за допомогою лінеаризованого аналізу Бредфорда (Ernst and Zor, 2010) та гелю електрофорезу у поліакриламідному гелі (PAGE). Просвітлений лізат, що містить GST-мічені рекомбінантні білки, змішували з 200 мкл PBS, врівноваженої глутатіон-сефарози 4В, та інкубували 4 години при +4 °С на ротаційному лабораторному шейкері (Biosan). Суспензію осаджували центрифугуванням при 500 g впродовж 1 хв при +4 °С. Супернатант відкидали, а суспензію ресуспендували в 1 мл PBS, центрифугували впродовж 1 хв при 500 g при +4 °С, супернатант відкидали, щоб змити залишки незв'язаних білків. Процедура промивання повторювали 3 рази. Суспензія, що залишилася, містила білки, пов'язані з GST, які готові для експерименту з GST пулдауном.

GST пулдаун. Рівні кількості очищеного домену РН (5 мкг) наносили на суспензію глутатіон-сефарози, що містить білок інтересу, та паралельно суспензію глутатіон-сефарози, що містить лише білок GST (негативний контроль) та інкубували протягом ночі при +4 °С на ротаційному лабораторному шейкері (Biosan). Після інкубації суспензію осаджували центрифугуванням при 500 g впродовж 1 хв при +4 °С, частина супернатанту була збережена для подальшого аналізу і суспензію промивали 3 рази PBS, як описано раніше в розділі експресії білка, і білки, зв'язані з GST, елюювали з глутатіон-сефарози шляхом інкубації dghljld; 3 год з буфером для елюції GST (PBS, що містить 10 мМ відновленого глутатіону) при +4 °С на ротаційному лаборатор-

ному шейкері (Biosan), осаджували центрифугуванням при 13000 g впродовж 10 хв при +4 °С. Супернатант збирали в нову пробірку для подальшого аналізу та визначали концентрацію білка в елюйованих зразках за допомогою лінеаризованого аналізу Бредфорда (Ernst and Zor, 2010).

Перенос білків та вестерн-блот аналіз. Електрофорез у поліакриламідному гелі (PAGE) проводили у вертикальній системі BioRad protean Tetra Cell у 10%-вому гелі для розділення відповідно до стандартного протоколу (Litovchick, 2018). Рівні кількості елюйованих білків (10 мкг) після GST пулдауну в буфері для завантаження наносили в кожен лунку гелю разом із 5 мкл маркером молекулярної ваги Prestained wide range molecular weight marker (Clever Scientific, CSL-BBL). Електрофорез проводили при 120 В до тих пір, поки фронт міграції барвника не вийде з гелю в буферну ємність. Поліакриламідний гель поміщали в сендвіч з нітроцелюлозною мембраною 0,22 мкм і перенос протеїну проводили в камері для вологого перенесення BioRad протягом 2 год при струмі 200 мА. Ефективність перенесення оцінювали перенесенням Prestained wide range molecular weight marker (Clever Scientific, CSL-BBL) на мембрану. Мембрану інкубували в 10 мл 5 % знежиреного сухого молока в PBS впродовж 1 год при температурі навколишнього середовища на платформі для перемішування з метою блокування нітроцелюлозної мембрани. Після блокування 10 мл розведення 1 : 400 антитіл проти полігістидину (Sigma Aldrich, MAB3844) у 5 % знежиреному сухому молоці в PBST додавали поверх мембрани та інкубували впродовж ночі при +4 °С на платформі для перемішування. Після інкубації з первинними антитілами мембрану інкубували з буфером PBST впродовж 10 хв при кімнатній температурі після видалення буфера PBST для очищення мембрани від неспецифічного зв'язування. Процедура промивання повторювали 3 рази. 10 мл HRP-кон'югованих козячих антимишачих вторинних антитіл (Abclonal), розведених 1 : 5000 у буфері PBST, додавали до мембрани та інкубували 1 год при температурі навколишнього середовища на платформі для перемішування. Мембрану відмивали 3 рази від вторинних антитіл буфером

PBST, як описано раніше. Мембрану інкубували впродовж 1 хв з 1 мл буфера з посиленою хемілюмінесценцією (ECL), що містив 100 мМ трис рН 8,8, 2,5 мМ люмінол, 0,4 мМ кумаринової кислоти та 0,02 % H_2O_2 , і сигнал хемілюмінесценції виявляли за допомогою системи BioRad Chemidoc з часом експозиції, оптимізованим для найкращого сигналу відношення до шуму.

Культивування клітин та флуоресцентна мікроскопія. Клітини HEK293T трансфікували плазмідною pmCitrine-C1-PH з використанням поліетиленіміну (PEI) і обробляли мишачими антитілами проти кортактину (Santa-Cruz Biotechnology, sc-55579) і кролячими антитілами до CLTA (Abclonal, A3793). Клітини K562 обробляли мишачими антитілами проти кортактину (Santa-Cruz Biotechnology, sc-55579) і кролячими анти-BCR антитілами (Abclonal, AA0068). Для виявлення флуоресценції використовували вторинні протимишачі антитіла Star580 (Abberior Instruments) і протикролячі антитіла StarRED (Abberior Instruments). Для отримання зображень мікропрепаратів у різних каналах флуоресценції використовувався мікроскоп Leica SP8 STED-3D з іммерсійним об'єктивом 100× і числовою апертурою 1,4. Флуоресцентний білок Citrine-PH збуджували лазером з довжиною хвилі 515 нм, флуорофори Star580 і StarRED збуджували довжинами хвилі лазера 564 нм і 633 нм відповідно. Для стимульованого виснаження випромінювання використовувався 594 нм лазер STED для Citrine, а 775 нм лазер STED використовувався для виснаження флуорофорів StarRED і Star580. Протоколи умов культивування клітин, трансфекції, фіксації клітин, імунофлуоресценції та приготування мікропрепаратів були описані раніше (Gurianov et al, 2021a). Обробку зображень і деконволюцію було виконано в плагіні DeconvolutionLab Fiji, як описано раніше (Gurianov et al, 2021b).

Результати та обговорення. Вестерн-блот аналіз зразків після GST-pulldown показали, що повнорозмірний рекомбінантний білок FBP17 прямо взаємодіє з РН-доменом BCR (рис. 1).

Це узгоджується з нашою попередньою роботою, яка показала, що FBP17 колокалізується з BCR біля периферійних ділянок клітин під час фагоцитозу в клітинній ліній мишиних

макрофагів J774 (Antonenko et al, 2023). Ці результати передбачають активну роль BCR частини гібридного білка BCR/ABL у динаміці мембран. Іншим важливим учасником у перебудові мембран та цитоскелету є кортактин. В цьому дослідженні ми показуємо, що він колокалізується з BCR в центросомній та примембранній області клітин K562 cells (рис. 2), а також з РН-доменом білка BCR та клатрином в клітинах HEK293T (рис. 3). Такий внутрішньоклітинний розподіл кортактину та BCR вказує на те, що BCR бере участь у везикулярному транспорті та ремоделюванні мембран. Колокалізація була підтверджена за допомогою STED-мікроскопії, при цьому білки були розташовані ближче, ніж дозволяє розділити ефективна роздільна здатність методу (~40 нм), що вказує на потенційну пряму взаємодію. Щоб підтвердити цю гіпотезу, ми провели аналіз результатів GST-пулдауну з подальшим вестерн-блоттингом, який підтвердив пряму взаємодію між очишеним рекомбінантним РН-доменом BCR і повнорозмірним кортактином (рис. 4, а). Білково-білкові взаємодії часто опосередковуються доменами, гомологічними Src (SH). Кортактин містить домен SH3, що спонукало нас дослідити, чи взаємодіє цей домен з РН-доменом BCR. Цікаво, що в наших експериментах з GST-пулдауном та вестерн-блоттингом не було виявлено взаємодії між рекомбінантним SH3-доменом кортактину та РН-доменом BCR (рис. 4, б). Цей результат дозволяє припустити, що інші домени кортактину, такі як актин-зв'язувальний або NTA-домени, можуть опосередковувати цю взаємодію. Окрім цього, специфічна конформація повнорозмірного кортактину може мати вирішальне значення для його взаємодії з доменом РН, задавати структурний контекст, який не може бути відтворений за допомогою лише ізольованого домену SH3. Підтверджені взаємодії між РН-доменом BCR і кортактином і FBP17 підкреслюють важливу роль BCR в процесах ремоделювання мембран і цитоскелета, особливо під час ендоцитозу, опосередкованого клатрином, і раннього формування ендосом. Оскільки і кортактин, і FBP17 беруть участь у цих процесах, їх взаємодія з доменом РН може пояснити чітку субклітинну локалізацію ізоформи p210 BCR/ABL (Wetz-

ler et al, 1993). На відміну від ізоформи р190, яка більш рівномірно розподілена в цитоплазмі, ізоформа р210, здається, більш обмежена ділянками, пов'язаними з мембраною (Telegeev et al, 2004; Wetzler et al, 1993). Ми припускаємо, що ці взаємодії допомагають прикріплюватись BCR/ABL р210 до певних клітинних компартментів, що потенційно обмежує місця, де проявляє себе постійна активність тирозинкінази ABL-частини цього гібридного білка. Ця визначена локалізація може лежати в основі менш агресивного фенотипу мієлопроліферативного захворювання, пов'язаного з р210, порівняно з ізоформою р190, яка не має області РН і має більш широке внутрішньоклітинне поширення. Крім того, фосфорилування кортактину та FBP17 ABL-кіназою може змінювати їх звичайні функції, порушуючи ремоделювання цитоскелету та везикулярний транспорт, а також сприяти онкогенній трансформації гемопоетичних клітин (Wang et al, 2008). Майбутні дослідження повинні експериментально визначити, чи фосфорилуються кортактин та FBP17 ABL-кіназою, оскільки це було передбачено лише біоінформатино в нашій попередній роботі (Gurianov et al, 2016). Крім того, делеційні мутанти кортактину та FBP17, у яких відсутні ключові домени, можуть допомогти точно визначити регіони, відповідальні за їх взаємодію з доменом РН, та їх роль у визначенні специфічної субклітинної локалізації BCR/ABL р210. Як у поточному дослідженні, так і в нашій попередній роботі (Gurianov et al, 2021b) ми спостерігали, що колокалізація між кортактином, клатрином та BCR переважно відбувається поблизу клітинного ядра, ймовірно, в межах центросомної області. Здатність лише домену РН спільно локалізуватися з цими білками в центросомній області настійно свідчить про те, що цей домен відповідає за закріплення BCR та злитого білка BCR/ABL на центросому. Можна припустити, що якщо злитий білок BCR/ABL приєднаний до центросомної області за допомогою свого РН-домену і взаємодіє з такими білками, як кортактин, FBP17 і клатрин, це може мати глибокий вплив на клітинні сигнальні шляхи. Центросома служить основним сигнальним вузлом, що керує такими процесами, як по-

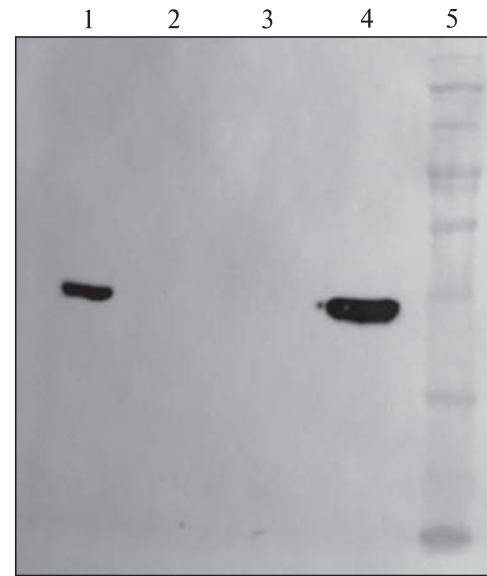


Рис. 1. Вестерн-блот аналіз результатів GST пулдауну рекомбінантного FBP17, міченого GST, з РН-доменом BCR, міченого гістидином. 1 – фракція елюції his-міченого РН домену BCR; 2 – загальний лізат *E. coli* BL21 Rosetta в яких була експресія рекомбінантного GST-FBP17; 3 – фракція елюції білка GST, що зв'язувався з глутатіон-сефарозою (негативний контроль); 4 – фракція елюції GST-FBP17, що зв'язувався з глутатіон-сефарозою; 5 – маркер молекулярної ваги. Виявлення смуги у лунці 4 та її відсутність у 3 вказує на пряму взаємодію між FBP17 та РН-доменом BCR

діл клітин, організація цитоскелету та внутрішньоклітинний транспорт (Conduit et al, 2015). Таким чином, його асоціація з онкогенними білками, такими як BCR/ABL, може змінювати нормальні клітинні функції та сприяти злоякісній трансформації. По-перше, центросомна локалізація BCR/ABL може порушити регуляцію клітинного циклу (Patel and Gordon, 2009). Центросома відіграє ключову роль у формуванні мітотичного веретена, і порушення його функціонування часто призводить до геномної нестабільності, що є ознакою раку (Nigg, 2006). Взаємодіючи з кортактином, який, як відомо, регулює ремоделювання цитоскелету актину та динаміку мікротрубочок, BCR/ABL може впливати на збірку або орієнтацію веретена, що потенційно призводить до аномального поділу клітин та анеупloidії (Wang et al, 2008). По-друге, взаємодія FBP17 і клатрину в центросомальній області

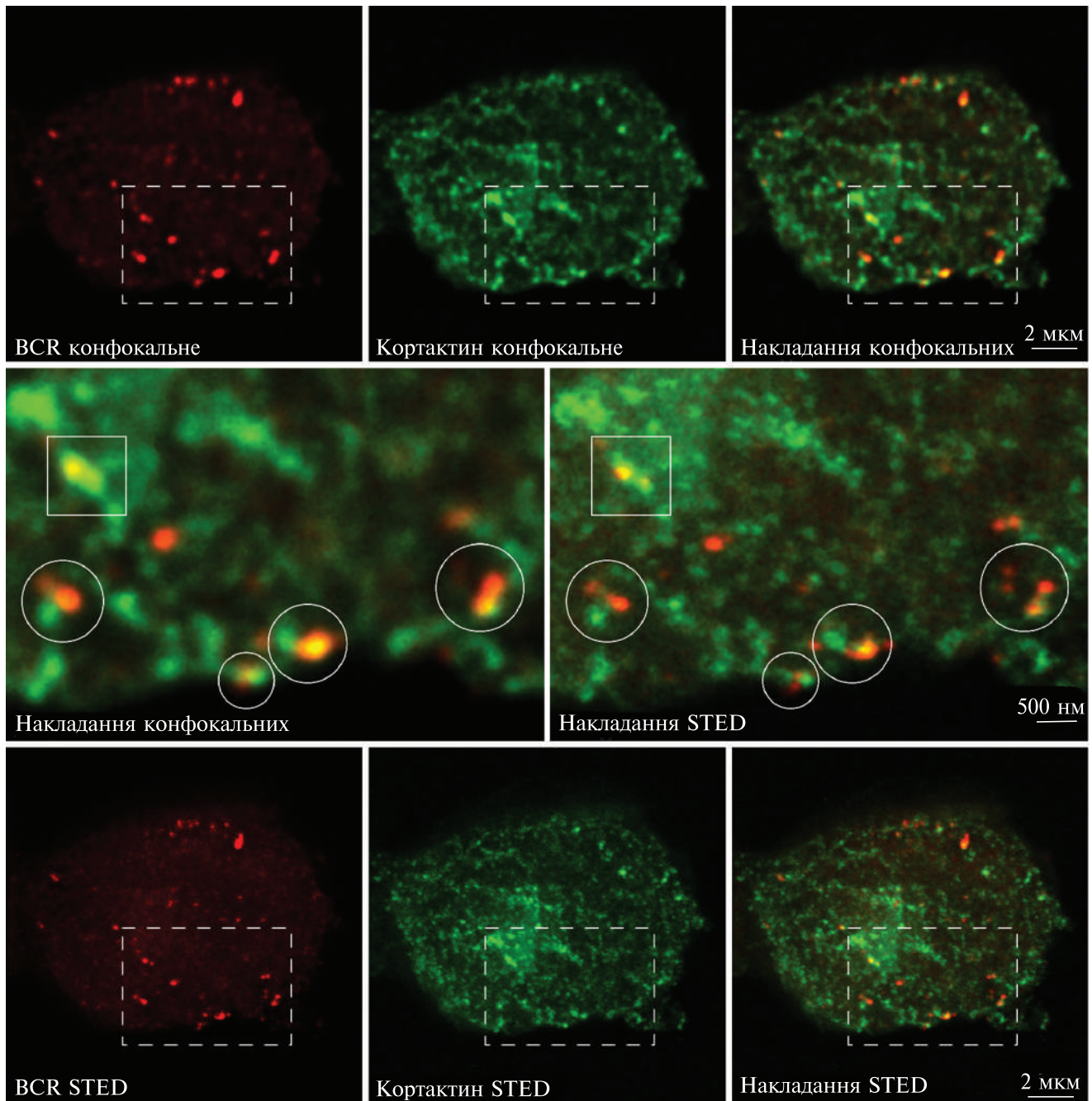


Рис. 2. Конфокальні та STED зображення зафіксованих клітин K562 оброблених анти-BCR та анти-кортактин антитілами та відповідними вторинними антитілами. Збільшена ділянка показує колокалізацію між кортактином та BCR в області центросоми (квадратна область інтересу) та перимембранній області на периферії клітини (круглі області інтересу)

може посилити рух везикул і динаміку мембран у цьому місці, впливаючи на розподіл ключових сигнальних молекул. Це може призвести до просторового обмеження активності тирозинкінази, обмежуючи фосфорилювання суб-

тратив областю центросоми (Lee et al, 2014). Така локалізована сигналізація може вибірково активувати шляхи, що беруть участь у опосередкованій центросомою проліферації або виживанні клітин, не впливаючи на інші

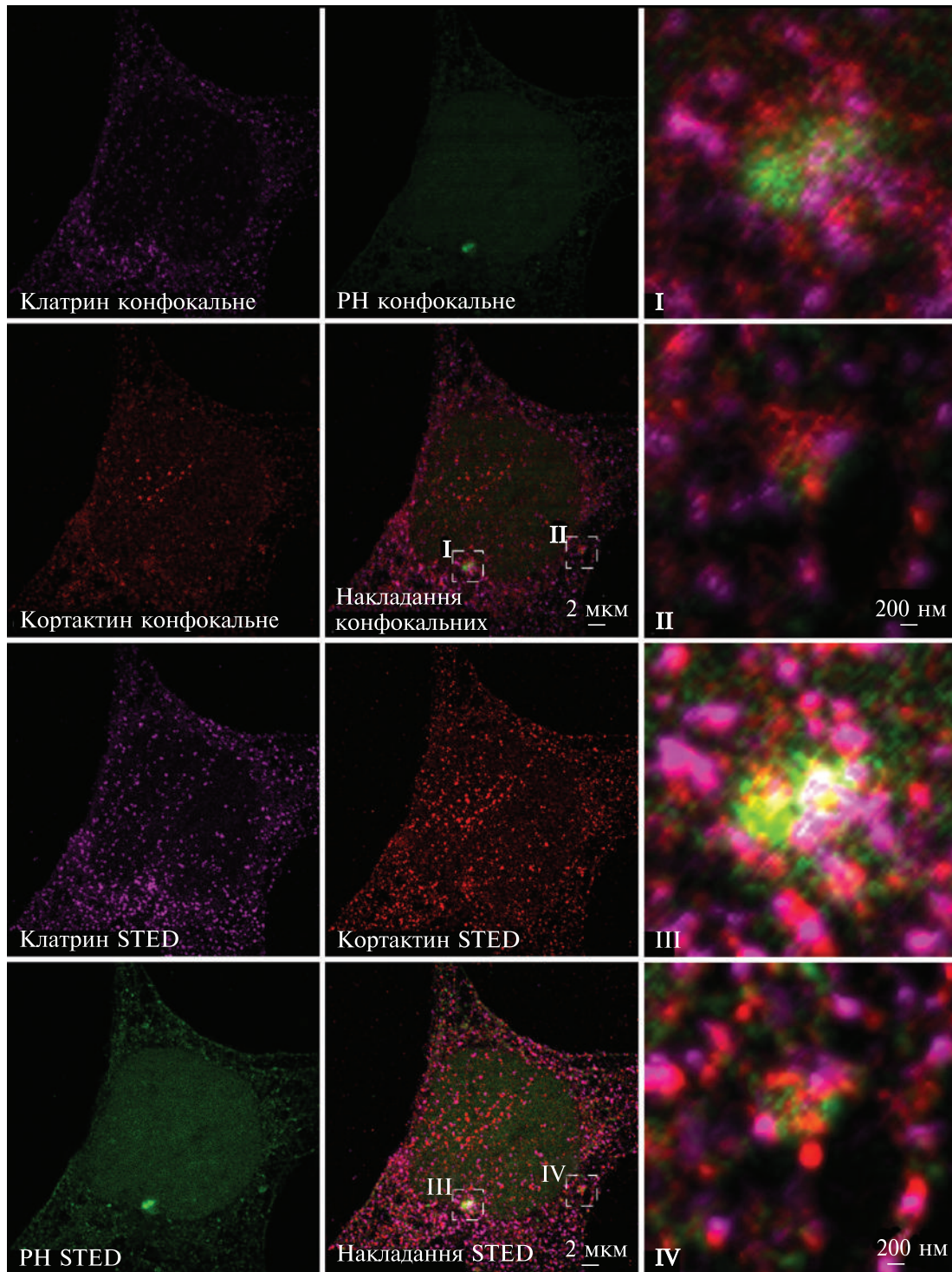


Рис. 3. Конфокальні та STED зображення клітин HEK293T трансфікованих pmCitrine-C1-PH та оброблені імунофлуоресцентними антитілами проти кортактину та клатрину А. Збільшені ділянки конфокальних (I та II) і STED зображень (III та IV) показують колокалізацію між PH-доменом BCR, кортактином та клатрином в центрсомальному регіоні біля ядра клітини (I та III) та на периферії клітини (II та IV). Це вказує на те, що кортактин та PH-домен BCR можуть бути залучені як у клатрин залежному ендоцитозі, так і в процесах пов'язаних з центросомою

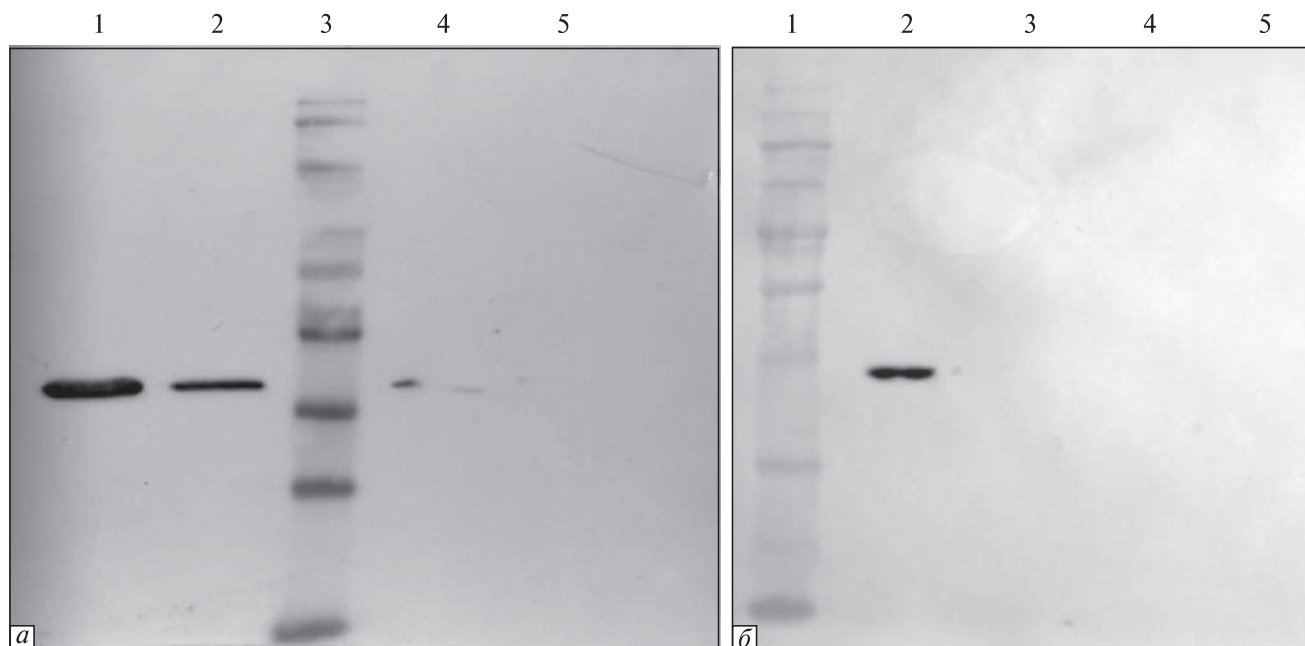


Рис. 4. Вестерн-блот-аналіз GST пулдауну рекомбінантного GST-кортактину (а) і GST-міченого SH3 домену кортактину (б) з his-міченим доменом PH BCR: Зображення а: 1 – елюат his-міченого домену PH; 2 – очищений мічений his-домен PH, який інкубували з GST-міченими білками, зв'язаними з глутатіонсефарозою; 3 – маркер молекулярної маси; 4 – фракція, елюована з GST-кортактином, який був зв'язаний з глутатіонсефарозою; 5 – фракція, елюована з білком GST, який зв'язувався з глутатіонсефарозою (негативний контроль). Зображення б: 1 – маркер молекулярної маси; 2 – фракція елюції міченого гістидином PH домену BCR; 3 – загальний лізат *E. coli* BL21 Rosetta, що експресує рекомбінантний GST-мічений домен SH3 CTTN; 4 – фракція, елюована з білком GST, який зв'язувався з глутатіонсефарозою (негативний контроль); 5 – фракція, елюована з GST-міченим доменом SH3 CTTN, який був зв'язаний з глутатіонсефарозою. Виявлення смуг, що відповідають his-міченому PH-доміну BCR, у фракції пулдауну повнорозмірного рекомбінантного GST-злитого кортактину та відсутність сигналу у фракції пулдауну GST-міченого домену SH3 кортактину демонструє наявність прямої взаємодії між кортактином і PH-доміном BCR, але така взаємодія не відбувається через SH3-домен CTTN, що вказує на те, що якась інша частина кортактину відповідає за таку взаємодію

шляхи, що потенційно сприяє менш агресивному фенотипу ХМЛ порівняно з усіма іншими. Більше того, роль центросоми як місця зосередження для різних кіназ свідчить про те, що локалізація BCR/ABL в ній може перехоплювати або модифікувати нормальну сигналізацію, пов'язану з центросомою. Наприклад, центросоми регулюють такі сигнальні шляхи, як PI3K/AKT (Zhao et al, 2014) та MAPK (Pancione et al, 2021), які мають вирішальне значення для росту та виживання клітин. Такі неприродні взаємодії BCR/ABL з цими шляхами в центросомі можуть посилювати онкогенні сигнали. Крім того, опосередковане клатрином утворення везикул у цій області може модулювати рециркуляцію

сигнальних рецепторів або зв'язування інгібіторних регуляторів, що ще більше підтримує аномальну проліферацію та стійкість до апоптозу. Нарешті, центросомна локалізація може сприяти взаємодії між BCR/ABL та механізмами відновлення ДНК, враховуючи близькість центросоми до ядерних структур під час інтерфази. Такі взаємодії можуть перешкоджати належним процесам відновлення ДНК, збільшуючи мутаційне навантаження та сприяючи прогресуванню лейкемії (Giehl et al, 2005). Ці потенційні ефекти підкреслюють важливість спостережуваної колокалізації та висвітлюють необхідність подальшого дослідження молекулярних наслідків прикріплення BCR/ABL до центросоми. Майбутні дослідження

мають виявити, як ці взаємодії впливають на каскади передачі сигналів та сприяють лейкемогенезу, пропонуючи потенційні шляхи для цілеспрямованих терапевтичних втручань.

Насамкінець, наші результати є важливим кроком до розуміння молекулярних механізмів онкотрансформації, пов'язаної з BCR/ABL, в гемопоетичних клітинах. Ці результати дають нові уявлення про розвиток хронічної мієлоїдної лейкемії та молекулярні відмінності між гострою лімфобластною лейкемією та хронічною мієлоїдною лейкемією. Ця робота може послужити основою для розробки нових діагностичних інструментів та терапевтичних підходів, що можуть бути потенційною альтернативою існуючим інгібіторам протеїнкіназ.

Дотримання етичних стандартів. Автори заявляють, що у них немає конфлікту інтересів. Дана стаття не містить ніяких досліджень за участю тварин або людей.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Ця робота була проведена завдяки українському державному фінансуванню та гранту I-Next grant (projectID: 8230) в межах програми the Horizon 2020.

DISTINCT FUNCTIONS OF THE PH DOMAIN IN BCR/ABL P210 ISOFORM: INTERACTION WITH CYTOSKELETAL AND MEMBRANE REMODELING PROTEINS

D.S. Gurianov, I.V. Kravchuk, S.V. Antonenko, M.V. Dybkov, M.G. Tesliuk, G.D. Telegeev

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, 03143

E-mail: dmitriy.gurianov@gmail.com

The BCR/ABL fusion protein, generated by the Philadelphia chromosome translocation, drives chronic myelogenous leukemia (CML) and other myeloproliferative disorders. The p210 isoform includes a pleckstrin homology (PH) domain absent in the p190 isoform, which is linked to acute lymphoblastic leukemia (ALL). This structural difference may underlie the distinct subcellular localization and signaling profiles of the two isoforms. Here, we investigate the role of the PH domain of BCR in interactions with cortactin and FBP17, proteins involved in cytoskeletal remodeling and membrane dynamics. Using GST-pulldown assays and western blotting, we demonstrated direct interactions between the PH domain of BCR and both cortactin and FBP17. Colocalization studies, supported by confocal and STED microscopy, revealed that cortactin colocalizes with the PH domain of BCR in the centrosomal and

perimembrane regions of cells. Notably, the SH3 domain of cortactin was not required for this interaction, but full-length cortactin was essential, suggesting that other domains mediate binding. These findings highlight the role of the PH domain in directing BCR/ABL to the centrosome, where it interacts with cortactin to potentially influence actin dynamics and vesicular trafficking. This centrosomal localization may spatially restrict the constitutive tyrosine kinase activity of ABL, contributing to the less aggressive phenotype of p210-associated CML compared to p190-driven ALL. Understanding the role of the PH domain as a key structural difference between p210 and p190 is critical for elucidating the molecular basis of BCR/ABL-mediated leukemogenesis. Future studies will explore the phosphorylation of cortactin and FBP17 by ABL kinase and the domains responsible for these interactions.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Antonenko SV, Gurianov DS, Kravchuk IV, Dybkov MV, Shvachko LP, Telegeev GD (2023) Role of BCR and FBNP1 Proteins in Phagocytosis as a Model of Membrane Rearrangements with Chronic Myelogenous Leukemia. *Cytol Genet* 57(4):291–297. <https://doi.org/10.3103/S0095452723040023/METRICS>
- Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D (1986) The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science (New York, N.Y.)* 233(4760):212–214. <https://doi.org/10.1126/science.3460176>
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acid Res* 7(6):1513–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- Buday L, Downward J (2007) Roles of cortactin in tumor pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1775(2):263–273. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.12.002>
- Conduit PT, Wainman A, Raff JW (2015) Centrosome function and assembly in animal cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16(10):611–624. <https://doi.org/10.1038/nrm4062>
- Cosen-Binker LI, Kapus A (2006) Cortactin: The Gray Eminence of the Cytoskeleton. *Physiology* 21(5):352–361. <https://doi.org/10.1152/physiol.00012.2006>
- Dowhan DH (2008) Purification and Concentration of Nucleic Acids. *Curr Protocols Essential Laboratory Techniq* 00(1):5.2.1–5.2.19. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.ET0502S00>
- Emilia G, Luppi M, Marasca R, Torelli G (1997) Relationship Between BCR/ABL Fusion Proteins and Leukemia Phenotype. *Blood* 89(10):3889–3889. https://doi.org/10.1182/blood.V89.10.3889.3889_3889_3889
- Ernst O, Zor T (2010) Linearization of the Bradford Protein Assay. *J Visualized Experim (JoVE)* 38:e1918. <https://doi.org/10.3791/1918>
- Froger A, Hall JE (2007) Transformation of Plasmid

- DNA into E. coli Using the Heat Shock Method. *J Visualized Experim (JoVE)* 6:e253. <https://doi.org/10.3791/253>
- Giehl M, Fabarius A, Frank O, Hochhaus A, Hafner M, Hehlmann R, Seifarth W (2005) Centrosome aberrations in chronic myeloid leukemia correlate with stage of disease and chromosomal instability. *Leukemia* 19(7):1192–1197. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403779>
- Gregor T, Bosakova MK, Nita A, Abraham SP, Fafilek B, Cernohorsky NH, Rynes, J, Foldynova-Trantirkova S, Zackova D, Mayer J, Trantirek L, Krejci P (2019) Elucidation of protein interactions necessary for the maintenance of the BCR–ABL signaling complex. *Cell Mol Life Sci: CMLS* 77(19):3885. <https://doi.org/10.1007/S00018-019-03397-7>
- Gu C, Yaddanapudi S, Weins A, Osborn T, Reiser J, Pollak M, Hartwig J, Sever S (2010) Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J* 29(21):3593–3606. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.249>
- Gurianov DS, Antonenko SV, Telegeev GD (2016) Colocalization of cortactin and PH domain of BCR in HEK293T cells and its potential role in cell signaling. *Biopolym Cell* 32(1):26–33. <https://doi.org/10.7124/bc.000909>
- Gurianov DS, Antonenko SV, Telegeev GD (2021a) Colocalization of BCR Protein with Clathrin, Actin, and Cortactin Suggests Its Possible Role in the Regulation of Actin Branching and Clathrin-Mediated Endocytosis. *Cytol Genet* 55(2):152–161. <https://doi.org/10.3103/S0095452721020055>
- Gurianov DS, Antonenko SV, Telegeev GD (2021b) PH domain of BCR provides colocalization of full-length BCR with centrosome together with cortactin to facilitate actin-organizing function. *Biopolym Cell*, 37(1):3–13. <https://doi.org/10.7124/BC.000A47>
- Hecht F, Morgan R, Schrier SL, Adams J, Sandberg AA (1985) The Philadelphia (Ph) chromosome in leukemia. I. A new mechanism due to interstitial deletion and insertion in chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogen* 14(1–2):3–10. [https://doi.org/10.1016/0165-4608\(85\)90209-2](https://doi.org/10.1016/0165-4608(85)90209-2)
- Hirata M, Kanematsu T, Takeuchi H, Yagisawa H (1998) Pleckstrin Homology Domain as an Inositol Compound Binding Module. *Japan J Pharmacol* 76(3):255–263. <https://doi.org/10.1254/jjp.76.255>
- Itoh T, Erdmann KS, Roux A, Habermann B, Werner H, De Camilli P (2005) Dynamin and the Actin Cytoskeleton Cooperatively Regulate Plasma Membrane Invagination by BAR and F-BAR Proteins. *Developmental Cell* 9(6):791–804. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.11.005>
- Jeannot P, Besson A (2020) Cortactin function in invadopodia. *Small GTPases* 11(4):256–270. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1405773>
- Krueger EW, Orth JD, Cao H, McNiven MA (2003) A dynamin-cortactin-Arp2/3 complex mediates actin reorganization in growth factor-stimulated cells. *Mol Biol Cell* 14(3):1085–1096. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-08-0466>
- Lee JY, Hong W-J, Majeti R, Stearns T (2014) Centrosome-kinase fusions promote oncogenic signaling and disrupt centrosome function in myeloproliferative neoplasms. *PloS One* 9(3):e92641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092641>
- Lemmon MA (2010) Pleckstrin homology (PH) domains. In *Handbook of Cell Signaling*, 2/e (2:1093–1101). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374145-5.00136-4>
- Lemmon MA, Ferguson KM (2001) Molecular determinants in pleckstrin homology domains that allow specific recognition of phosphoinositides. *Biochem Soc Transact* 29(4):377–384. <https://doi.org/10.1042/bst0290377>
- Lenoir M, Kufareva I, Abagyan R, Overduin M (2015) Membrane and Protein Interactions of the Pleckstrin Homology Domain Superfamily. *Membranes* 5(4):646–663. <https://doi.org/10.3390/membranes5040646>
- Lezin G, Kosaka Y, Yost HJ, Kuehn MR, Brunelli L (2011) A one-step miniprep for the isolation of plasmid DNA and lambda phage particles. *PloS One* 6:e23457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023457>
- Li D, Yang Y, Lv C, Wang Y, Chao X, Huang J, Singh SP, Yuan Y, Zhang C, Lou J, Gao P, Huang S, Li B, Cai H (2023) GxcM-Fbp17/RacC-WASP signaling regulates polarized cortex assembly in migrating cells via Arp2/3. *J Cell Biol* 222(6):e202208151. <https://doi.org/10.1083/JCB.202208151>
- Litovchick L (2018) Resolving Proteins for Immunoblotting by Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols* 2018(10):pdb.prot098434. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT098434>
- Maroun CR, Holgado-Madruga M, Royal I, Naujokas MA, Fournier TM, Wong AJ, Park M (1999) The Gab1 PH Domain Is Required for Localization of Gab1 at Sites of Cell-Cell Contact and Epithelial Morphogenesis Downstream from the Met Receptor Tyrosine Kinase. *Mol Cell Biol* 19(3):1784. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.3.1784>
- Maroun CR, Naujokas MA, Park M (2003) Membrane Targeting of Grb2-associated Binder-1 (Gab1) Scaffolding Protein through Src Myristoylation Sequence Substitutes for Gab1 Pleckstrin Homology Domain and Switches an Epidermal Growth Factor Response to an Invasive Morphogenic Program. *Mol Biol Cell* 14(4):1691. <https://doi.org/10.1091/MBC.E02-06-0352>
- Miroshnychenko D, Dubrovska A, Maliuta S, Telegeev G, Aspenström P (2010) Novel role of pleckstrin homology domain of the Bcr-Abl protein: analysis of protein-protein and protein-lipid interactions.

- Experim Cell Res 316(4):530–542. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.11.014>
- Nigg EA (2006) Origins and consequences of centrosome aberrations in human cancers. *Inter J Cancer* 119(12):2717–2723. <https://doi.org/10.1002/ijc.22245>
- Pancione M, Cerulo L, Remo A, Giordano G, Gutierrez-Uzquiza B, Bragado P, Porras A (2021) Centrosome Dynamics and Its Role in Inflammatory Response and Metastatic Process. *Biomolecules* 11(5):629. <https://doi.org/10.3390/BIOM11050629>
- Patel H, Gordon MY (2009) Abnormal centrosome-centriole cycle in chronic myeloid leukaemia? *British J Haematol* 146(4):408–417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07772.x>
- Quintás-Cardama A, Cortes J (2009) Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 113(8):1619–1630. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-144790>
- Reckel S, Gehin C, Tardivon D, Georgeon S, Kükenshöner T, Löhr F, Koide A, Buchner L, Panjkovich A, Reynaud A, Pinho S, Gerig B, Svergun D, Pojer F, Güntert P, Dötsch V, Koide S, Gavin AC, Hantschel O (2017) Structural and functional dissection of the DH and PH domains of oncogenic Bcr-Abl tyrosine kinase. *Nat Commun* 8(1):2101. <https://doi.org/10.1038/S41467-017-02313-6>
- Schnoor M, Stradal TE, Rottner K (2018) Cortactin: Cell Functions of A Multifaceted Actin-Binding Protein. *Trends in Cell Biol* 28(2):79–98. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.10.009>
- Snider CE, Wan Mohamad Noor WNI, Nguyen NTH, Gould KL, Suetsugu S (2021) The state of F-BAR domains as membrane-bound oligomeric platforms. *Trends Cell Biol* 31(8):644. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2021.03.013>
- Studier FW (2005) Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. In *Protein Expression and Purification* (41:207–234). <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>
- Taylor KL, Taylor RJ, Richters KE, Huynh B, Carrington J, McDermott ME, Wilson RL, Dent EW (2019) Opposing functions of F-BAR proteins in neuronal membrane protrusion, tubule formation, and neurite outgrowth. *Life Sci Alliance* 2(3):e201800288. <https://doi.org/10.26508/LSA.201800288>
- Taylor MJ, Perrais D, Merrifield CJ (2011) A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol* 9(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1000604>
- Telegeev GD, Dubrovskaya AN, Dybkov MV, Maliuta SS (2004) Influence of BCR/ABL fusion proteins on the course of Ph leukemias. *Acta Biochim Polonica* 51(3):845–849. <https://doi.org/10.1007/s00045-004-0384-5>
- Thomas CC, Deak M, Alessi DR, van Aalten DMF (2002) High-Resolution Structure of the Pleckstrin Homology Domain of Protein Kinase B/Akt Bound to Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphate. *Curr Biol* 12(14):1256–1262. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00972-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00972-7)
- Tsujita K, Suetsugu S, Sasaki N, Furutani M, Oikawa T, Takenawa T (2006) Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J Cell Biol* 172(2):269. <https://doi.org/10.1083/JCB.200508091>
- Wang W, Chen L, Ding Y, Jin J, Liao K (2008) Centrosome separation driven by actin-microfilaments during mitosis is mediated by centrosome-associated tyrosine-phosphorylated cortactin. *J Cell Sci* 121(8):1334–1343. <https://doi.org/10.1242/jcs.018176>
- Weaver AM (2008) Cortactin in tumor invasiveness. *Cancer Letters* 265(2):157–166. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.066>
- Weed SA, Parsons JT (2001) Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene* 20(44):6418–6434. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204783>
- Wetzler M, Talpaz M, Van Etten RA, Hirsh-Ginsberg C, Beran M, Kurzrock R (1993) Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *J Clin Investigat* 92(4):1925–1939. <https://doi.org/10.1172/JCI116786>
- Wu H, Parsons JT (1993) Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J Cell Biol* 120(6):1417–1426. <https://doi.org/10.1083/jcb.120.6.1417>
- Yugandhar K, Gupta S, Yu H (2019) Inferring Protein-Protein Interaction Networks From Mass Spectrometry-Based Proteomic Approaches: A Mini-Review. *Computat Struct Biotechnol J* 17:805–811. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2019.05.007/ASSET/8DF32536-B356-453D-8D1C-B04C45674C70/MAIN.ASSETS/GR1.JPG>
- Zhao J, Zou Y, Liu H, Wang H, Zhang H, Hou W, Li X, Jia X, Zhang J, Hou L, Zhang B (2014) TEIF associated centrosome activity is regulated by EGF/PI3K/Akt signaling. *Biochim Biophys Acta (BBA) – Mol Cell Res* 1843(9):1851–1864. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2014.04.021>
- Zhu J, Zhou K, Hao J-J, Liu J, Smith N, Zhan X (2005) Regulation of cortactin/dynamin interaction by actin polymerization during the fission of clathrin-coated pits. *J Cell Sci* 118(Pt 4):807–817. <https://doi.org/10.1242/jcs.01668>

Надійшла в редакцію 03.11.2024
Після доопрацювання 20.11.2024
Прийнята до друку 18.03.2025