

На правах рукописи

Мартьянов Алексей Александрович

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ
ЧЕРЕЗ РЕЦЕПТОРЫ СЛЕС-2 И GPVI**

Специальность: 1.5.2 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном Государственном Бюджетном Учреждении Науки Центре Теоретических Проблем Физико-Химической Фармакологии Российской Академии Наук (ФГБУН ЦТП ФХФ РАН).

Научный руководитель

Свешникова Анастасия Никитична, доктор физико-математических наук.

Официальные оппоненты

Мазуров Алексей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, и.о. руководителя лаборатории клеточной адгезии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Колесников Станислав Сергеевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной физиологии клетки, Института биофизики клетки Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2022 года в ___ часов __ минут на заседании Диссертационного совета 24.1.038.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, д. 38, и на сайте https://biochemphysics.ru/assets/uploads/Диссертация_Мартьянов.pdf

Автореферат разослан «___» _____ 2022 года

Ученый секретарь диссертационного совета,

24.1.038.01, кандидат химических наук

Л.И. Мазалецкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Тромбоциты – безъядерные клетки крови размером 2-4 мкм, производящиеся в костном мозге и циркулирующие в кровотоке в течение 7-10 дней до момента утилизации в селезёнке или печени [1]. Основная задача тромбоцитов – предотвращение кровопотери при нарушении замкнутости кровеносной системы [1]. Для выполнения данной задачи тромбоциты способны переходить в так называемое активированное состояние при контакте с повреждением. Активированный тромбоцит может адгезировать к стенкам сосуда и агрегировать с другими клетками за счет активных интегринов, секретировать гранулы и молекулы-активаторы тромбоцитов, стимулировать свертывание плазмы крови.

При повреждении кровеносных сосудов происходит активация и гибель клеток сосудистого эндотелия, приводящая к появлению растворимых активаторов тромбоцитов – АДФ и тромбина, а также обнажение белков межклеточного матрикса, одним из которых является коллаген [1]. Тромбоциты адгезируют к коллагену не напрямую, а через молекулы фактора фон Виллебранда (ФВ) – мультимерного белка плазмы крови, который также секретирован эндотелиоцитами при их активации – одним концом связывающиеся с коллагеном, а другим – с тромбоцитами [1]. Находясь в непосредственной близости от коллагена, тромбоциты активируются от него через рецептор-гликопротеин VI (GPVI) [2]. Активация тромбоцитов коллагеном значительно замедлена по сравнению с другими известными агонистами, такими как аденозиндифосфат (АДФ) и тромбин [3].

Помимо гемостаза тромбоциты играют значимую роль для нормального эмбрионального развития организма и формирования новых сосудов (ангиогенеза) [4]. Показано, что при разделении кровеносной и лимфатической систем у эмбрионов млекопитающих ключевым является взаимодействие тромбоцитарного лектин-подобного рецептора С-типа 2го рода (CLEC-2) и подопланина – гликопротеина, экспрессируемого клетками лимфатического

эндотелия [5], при этом CLEC-2-индуцированная активация тромбоцитов медленнее GPVI-индуцированной [6]. При капошиформной гемангиоэндотелиоме (КГЭ) – редкой сосудистой опухоли, экспрессирующей подоплатин – наблюдается тромбоцитопения и развитие диссеминированного внутрисосудистого свёртывания [7]. Совместно CLEC-2 и GPVI принципиально важны для поддержания структуры тромбов и задействованы в ряде других патологий [4].

Связывание рецепторов GPVI с коллагеном или рецепторов CLEC-2 с подоплатином инициирует кластеризацию этих рецепторов на поверхности тромбоцитов [2; 8]. Показано, что в тромбоцитах присутствует сразу несколько механизмов кластеризации мембранных рецепторов: кластеризация непосредственно лигандом, кластеризация за счёт перестроения актинового цитоскелета или кластеризация в результате изменения микродоменной структуры мембраны тромбоцитов [8]. Роль динамики и паттерна кластеризации рецепторов на поверхности тромбоцитов для дальнейшей сигнализации в тромбоцитах неясна.

При кластеризации рецепторов GPVI происходит фосфорилирование их цитоплазматических доменов тирозинкиназами семейства Src (SFK) [9]. Кластеризованные и активированные рецепторы CLEC-2 фосфорилируются тирозинкиназами Syk [9]. С фосфорилированными GPVI и CLEC-2 связываются неактивные Syk, что приводит к их активации [4]. Для активации одной Syk-киназы достаточно одной молекулы GPVI. CLEC-2, с другой стороны, активирует Syk только будучи димеризованным [9]. Активные Syk запускают формирование сигналосомы, в основе которой лежит линкерный адаптерный T-клеточный белок (LAT) [9]. В составе LAT-сигналосомы происходит активация фосфолипазы C γ 2 (ФЛС γ 2). ФЛС γ 2 гидролизует фосфоинозитол-4,5-бисфосфат (ФИФ $_2$), находящийся в мембране тромбоцитов, производя инозитол-3,4,5-трифосфат (ИФ $_3$) – вторичный мессенджер активации тромбоцитов, который активирует рецептор к ИФ $_3$ (ИФ $_3$ Р) на поверхности эндоплазматического ретикулума (ЭПР) [9]. Активация ИФ $_3$ Р инициирует выход из ЭПР свободных ионов кальция –

основного регулятора функциональных ответов тромбоцитов [10]. Кальциевая сигнализация определяет все функциональные ответы тромбоцитов на активацию: изменение формы, необходимое для увеличения площади поверхности закрытия повреждения; активацию мембранных интегринов $\alpha_{IIb}\beta_3$, необходимых для формирования тромбоцитарных агрегатов; секрецию тромбоцитарных α - и плотных гранул, необходимых для активации близлежащих клеток; прокоагулянтный ответ – митохондриально-зависимый некроз тромбоцитов, при котором происходит выставление фосфатидилсерина, основы для активации плазменного каскада свёртывания крови [1]. Определение ключевых механизмов инициации тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах является ключом для тонкой регуляции активации тромбоцитов через данный путь.

Несмотря на большой объём ранее опубликованных данных о последовательности событий при активации тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах, а также о физиологической значимости рецепторов CLEC-2 и GPVI, кинетические и динамические характеристики данных путей мало изучены. Определение конкретных стадий активации тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах, лимитирующих скорость, позволит идентифицировать новые мишени для терапевтического воздействия при тромбозах, возникающих в результате дисфункции данных сигнальных путей.

Степень разработанности темы исследования

Теоретические исследования GPVI-индуцированной активации тромбоцитов ограничиваются одной работой, в которой, однако, не рассматриваются ни кластеризация рецепторов, ни формирование LAT-сигналосомы, ни кальциевая сигнализация в целом. Методики теоретического описания кластеризации мембранных рецепторов весьма громоздки и редко позволяют описывать одновременно и кластеризацию, и более сложные процессы, происходящие при распространении внутриклеточного сигнала.

Таким образом, существует значительная неопределённость с точки зрения кинетических и динамических характеристик распространения внутриклеточного CLEC-2- или GPVI-индуцированного сигнала. В то время как

патофизиологическая значимость данных путей сигнализации была многократно продемонстрирована, значимость динамических характеристик активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и GPVI не изучалась.

Цель настоящего исследования – определение механизмов и скорость-лимитирующих реакций активации тромбоцитов через рецепторы, ассоциированные с тирозинкиназами.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Построение схемы внутриклеточной тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах, индуцируемой рецепторами CLEC-2 и GPVI на основе литературных данных;
2. Определение механизма активации тромбоцитов через рецептор CLEC-2 и скорость-лимитирующих стадий данного процесса путем системно-биологического подхода;
3. Разработка экспериментальной методики анализа CLEC-2- или GPVI-индуцированной кальциевой сигнализации в тромбоцитах здоровых доноров и пациентов с гематологическими заболеваниями;
4. Исследование механизма нарушения CLEC-2-индуцированной внутриклеточной кальциевой сигнализации у пациентов с КГЭ.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования являются тромбоциты человека. **Предмет исследования** – внутриклеточная сигнализация, индуцируемая рецепторами CLEC-2 и GPVI в тромбоцитах человека.

Научная новизна работы

Составлена полная схема внутриклеточной тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах при их активации через рецепторы CLEC-2 и GPVI. На основании данной схемы разработана первая математическая модель внутриклеточной тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах. Для корректного учёта кластеризации рецепторов при их активации был разработан новый теоретический подход. Было показано, что кластеризация рецепторов является одной из скорость-лимитирующих реакций для активации тирозинкиназой

сигнализации в тромбоцитах. Также с помощью модели было предсказано, что динамика кластеризации рецепторов может значительно влиять на активацию тромбоцитов. Данные результаты были подтверждены как на основе литературных данных, так и экспериментально.

Для исследования тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах был создан метод анализа динамики кальциевого ответа тромбоцитов на активацию с помощью проточной цитометрии. Данным методом впервые было показано, что CLEC-2 индуцирует кальциевый ответ в тромбоцитах. Также было получено, что температура и насыщение мембраны холестерином значительно влияют на скорость активации тромбоцитов через рецептор CLEC-2. Это может свидетельствовать о значимости кластеризации рецепторов для тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах. Было получено, что ответы тромбоцитов здоровых доноров на GPVI-индуцированную активацию значительно различаются. Модель предсказала, что вариабельность ответов объясняется разными количествами рецепторов GPVI на поверхности тромбоцитов здоровых доноров, что сходится с данными из литературы.

Было получено, что у пациентов с КГЭ значительно нарушена активация тромбоцитов через рецептор CLEC-2. Можно предположить, что в опухолях этих пациентов происходит фильтрация тромбоцитов: тромбоциты с высокой экспрессией CLEC-2 остаются в опухоли, тромбоциты с низкой экспрессией CLEC-2 циркулируют в кровотоке. Модель также подтверждает такую возможность.

Теоретическая значимость работы

Полученные в рамках настоящей работы результаты подчёркивают значимость понимания механизмов и динамики процессов кластеризации для нормальной внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах. Разработанный теоретико-экспериментальный подход может быть использован для исследования широкого спектра биологических сигнальных систем как в тромбоцитах, так и в других клетках.

Практическая значимость работы

Разработанная экспериментальная методика может быть использована для исследования внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах здоровых доноров и пациентов, что позволит идентифицировать механизмы развития нарушений функции тромбоцитов. Разработанная модель может быть использована для исследования механизмов развития гематологических заболеваний и исследования эффектов различных вариантов терапии на функцию тромбоцитов пациентов.

Методология и методы исследования

Экспериментальные данные по динамике фосфорилирования тирозинов в ответ на стимуляцию тромбоцитов активатором рецепторов CLEC-2 были получены методом вестерн-блоттинга. Анализ кальциевой сигнализации в суспензии тромбоцитов проводился с помощью проточной цитометрии тромбоцитов, загруженных кальций-чувствительными флуорофорами. Анализ динамики формирования LAT-сигналом при активации тромбоцитов через рецептор CLEC-2 при различных условиях осуществлялся с помощью флуоресцентной микроскопии.

Разработка компьютерной модели проводилась следующим образом: на основе литературных данных строилась схема процесса, которая ложилась в основу теоретической модели. Модель представляла собой систему дифференциальных уравнений, которая интегрировалась численным методом для интегрирования жёстких и нежёстких систем обыкновенных дифференциальных уравнений (LSODA) в среде разработки COPASI или же на языке программирования Python 3.8. Уравнения модели, в основном, полагались на закон действующих масс и уравнение Михаэлиса-Ментен. Параметры модели были либо взяты из литературных источников, либо подобраны на основании доступных из литературы данных или же данных, полученных экспериментально в рамках диссертационной работы. Полученные с помощью модели предсказания проверяются экспериментально или на основе литературных данных.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана экспериментальная методика наблюдения первичного кальциевого ответа тромбоцитов здоровых доноров и пациентов, в том числе с тромбоцитопенией, на стимуляцию растворимыми активаторами;
2. В рамках системно-биологического подхода показано, что ключевыми этапами активации тромбоцитов через ассоциированные с тирозинкиназами рецепторы являются кластеризация рецепторов и сборка LAT-сигналысомы;
3. Температура и насыщение мембраны тромбоцитов холестерином оказывают значительное влияние на CLEC-2-индуцированную сборку LAT-сигналысомы и внутриклеточную сигнализацию в тромбоцитах в целом;

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечивались использованием общепринятых современных методов, таких как проточная цитометрия, флуоресцентная микроскопия, вестерн блоттинга, статистическая обработка результатов, а также использованием распространенных методов математического моделирования и статистической обработки данных, реализованных в общедоступных программных пакетах. Достоверность полученных результатов также подтверждается их согласованностью с известными литературными источниками.

Личный вклад автора заключается в анализе научной литературы, разработке математических моделей CLEC-2- и GPVI-индуцированной сигнализации в тромбоцитах, планировании и проведении экспериментов по проточной цитометрии, постановке экспериментов по вестерн-блоттингу, дизайну и пробоподготовке экспериментов по флуоресцентной микроскопии, подготовке иллюстраций, написания научных статей и тезисов по материалам работы. Материалы диссертации доложены автором в устных докладах на международных конференциях.

Апробация работы.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на European Congress on Thrombosis and Hemostasis 2016 (28-30 сентября 2016, г.

Гаага, Нидерланды); XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Hemostasis 2017 (8-13 июля 2017, г. Берлин, Германия); XXIII съезд Физиологического общества им. И. П. Павлова (18-22 сентября 2017, Воронеж, Россия); Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем (28-30 июня 2018, Минск, Беларусь); 65th Annual Meeting of the Scientific Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Hemostasis 2018 (18-21 июля 2018, г. Дублин, Ирландия); XXVI международная конференция «Математика. Компьютер. Образование» (28 января — 2 февраля 2019, Пущино, Россия); XXVII Congress of the International Society on Thrombosis and Hemostasis 2019 (6-10 Июля 2019, Мельбурн, Австралия); European Congress on Thrombosis and Hemostasis 2019 (2-4 октября 2019, Глазго, Великобритания).

Публикации: по материалам диссертации было опубликовано 17 работ, в том числе 7 статей в международных и российских рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, 10 тезисов в сборниках трудов международных научных конференций.

Структура диссертации

Диссертация изложена на 128 страницах машинописного текста и включает содержание, введение, обзор литературы (глава 1), описание материалов и методов (глава 2), исследование динамических характеристик тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах (глава 3), сравнение GPVI- и CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах (глава 4), заключение, выводы, список цитированной литературы (203 библиографических источника), список сокращений и обозначений, благодарности. Работа содержит 40 рисунков, 4 таблицы и 1 приложение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность выбранной темы, сформулированы цели и задачи исследования, показаны научная новизна и практическая значимость работы, кратко описано содержание работы по главам.

В **главе 1** представлен обзор литературы по теме работы, кратко описываются физиологические функции тромбоцитов, приводятся ключевые

этапы их участия в тромбообразовании, а также значимость сложной системы внутриклеточной сигнализации. Также в первой главе подробно описывается тирозинкиназная сигнализация в тромбоцитах, запускаемая рецепторами GPVI и CLEC-2. В конце раздела приводятся сведения о современных теоретических подходах к описанию активации тромбоцитов, перечисляются существующие математические модели внутриклеточной сигнализации и метаболизма тромбоцитов.

Глава 2 посвящена описанию материалов и методов работы.

В первой части главы описываются основные экспериментальные методы исследования. Приводится список использованных для в работе материалов, критерии включения в исследование здоровых взрослых и педиатрических доноров, а также пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой. Описывается подготовка экспериментальных образцов, а также приводятся протоколы экспериментов по вестерн-блоттингу, иммунофлуоресцентному анализу, а также методикам исследования внутриклеточной кальциевой сигнализации в тромбоцитах методом проточной цитометрии. Также приводятся основные принципы обработки и статистического анализа экспериментальных данных.

Во второй части главы приводятся принципы разработки теоретических моделей, перечисляются основные законы химической кинетики, использованные в работе, а также метод численного интегрирования модели LSODA. Дополнительно перечисляются методы подбора неизвестных параметров модели, а также методика анализа чувствительности модели к неизвестным параметрам.

В **главе 3** приводятся результаты исследования динамических характеристик CLEC-2-индуцированной сигнализации в тромбоцитах. Первая часть главы посвящена описанию схемы CLEC-2 индуцированных биохимических реакций в тромбоцитах, а также по-модульному описанию разработанной математической модели.

Для описания процесса кластеризации рецепторов в мембране исходя из принципов теории Смолуховского была разработана модель («N-уравнений»), где

кластер из i рецепторов обозначался как A_i и кинетика кластеризации рецепторов описывалась элементарными реакциями вида как $A_i + A_j \leftrightarrow A_{i+j}$ (рис. 1А).

Для включения в модель внутриклеточной сигнализации, модель «N-уравнений» была упрощена до модели «2х-уравнений», в которой вводится только две переменные – одиночные рецепторы и кластеры из рецепторов (рис. 1Б).

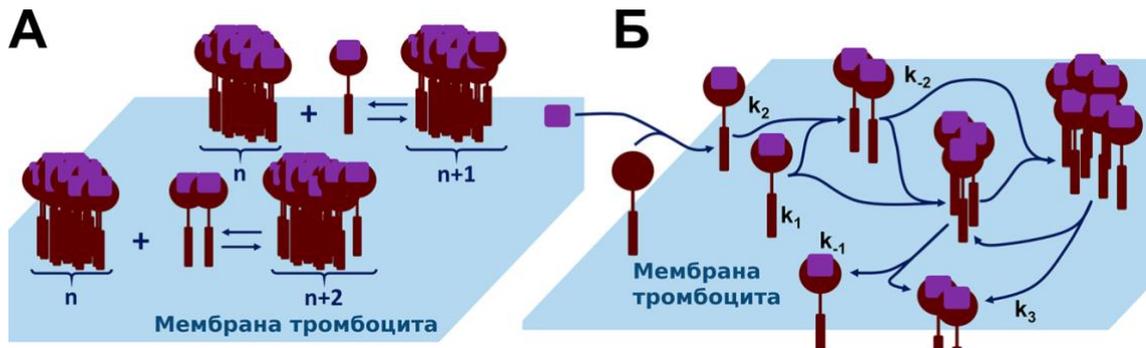


Рисунок 1 – А. Схема модели кластеризации рецепторов тромбоцитов, учитывающая в явном виде динамику концентраций кластеров всех размеров. Б – Схема модели кластеризации рецепторов тромбоцитов, описывающая динамику концентраций кластеров рецепторов в неявном виде

И модель из «N-уравнений», и модель из «2х уравнений» хорошо описывали кластеризацию как рецепторов CLEC-2 (рис. 2А), так и рецепторов GPVI (рис. 2Б) на мембранах тромбоцитов после активации тромбоцитов подоплатинном и коллагеном, соответственно. Данные по количествам рецепторов в кластерах были получены из экспериментальных данных, доступных в литературе: считалось, что количество рецепторов в кластерах пропорционально флуоресценции антител к рецепторам в каждый момент времени.

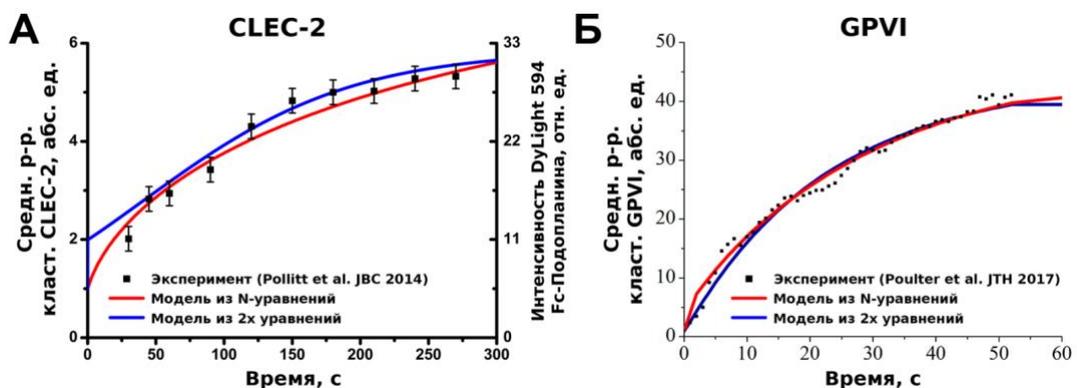


Рисунок 2 – Описание экспериментальных данных (чёрные точки) по кластеризации рецепторов CLEC-2 (А) и GPVI (Б) на тромбоцитах при их активации подоплатинном и коллагеном,

соответственно. Красные кривые – результаты расчёта модели из N-уравнений, синие кривые – результаты расчёта модели из 2х уравнений

Исследование модели показало, что в модели из «2х уравнений» существует два режима кластеризации, при которых динамика среднего размера кластера рецепторов практически совпадает (рис. 3А). Однако, несмотря на это, количество мономерных рецепторов CLEC-2 (рис. 3Б) было значительно больше при режиме кластеризации (2), в то время как количество кластеров рецепторов (рис. 3В) было значительно больше при режиме кластеризации (1). Таким образом, можно предположить, что при режиме кластеризации (1) происходит быстрое формирование большого числа кластеров малых размеров, которые затем растут, что обеспечивает увеличение среднего размера кластеров и уменьшение их общего количества. С другой стороны, при режиме кластеризации (2), наоборот, наблюдается медленное формирование небольшого количества кластеров, в то время как большая часть молекул CLEC-2 остаются мономерами. Скорость активации тромбоцитов при режиме кластеризации (2) не соответствовала экспериментальным данным из литературы.

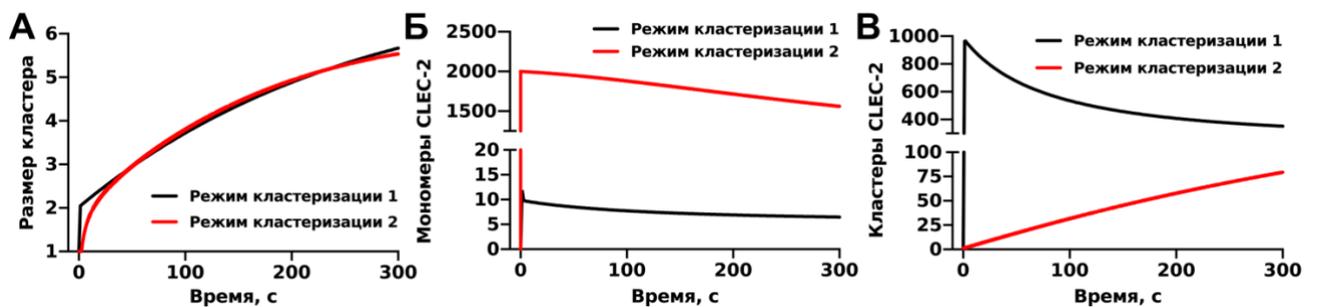


Рисунок 3 – Различные режимы кластеризации рецепторов позволяют получить одинаковую динамику среднего размера кластеров (А), при которой значительно различается динамика количества мономеров (Б) и кластеров (В) рецепторов

Модель CLEC-2-индуцированной активации тромбоцита кроме модуля кластеризации рецепторов содержала еще три модуля (рис. 4). Модуль «покоящееся состояние» описывал взаимодействие тирозинкиназ Syk, SFK и Csk, а также фосфатазы CD148 в покоящихся (неактивированных) тромбоцитах (рис. 4А). Взаимная активация тирозинкиназ в ответ на кластеризацию рецепторов описывалась модулем «Тирозинкиназы» (рис. 4Б). Модуль «LAT-PLC γ 2» описывал сборку LAT-сигнасомы и активацию кальциевой и фосфоинозитидной сигнализации (рис. 4В).

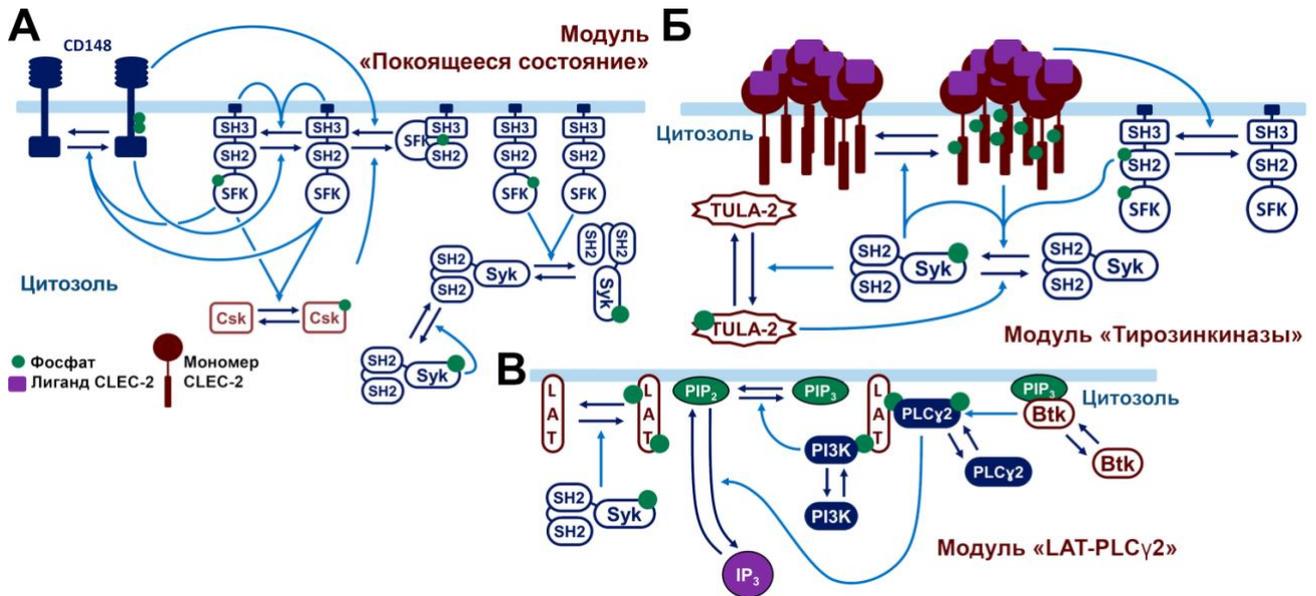


Рисунок 4 – Схема основной части модели CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах. А – Модуль «Покоящееся состояние». Б – Модуль «Тирозинкиназы». В – Модуль «LAT-PLCγ2»

Неизвестные параметры модулей «покоящееся состояние», «тирозинкиназы» и «LAT-PLCγ2» были подобраны с использованием доступных из литературы данных по вестерн-блот анализу динамики фосфорилирования Syk-киназ и LAT-адаптеров (рис. 5А и Б, соответственно). Также для подбора параметров были использованы данные из литературы по фосфорилированию SFK и ФЛСγ2.

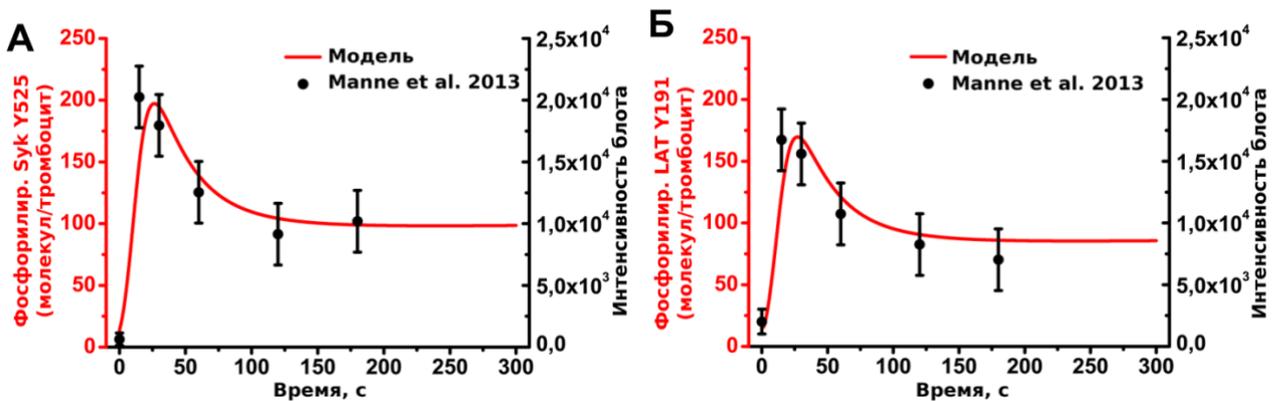


Рисунок 5 – Неизвестные параметры модели были подобраны так, чтобы модель (красные кривые) описывала экспериментальные данные по фосфорилированию Syk (А; чёрные точки) и LAT (Б; чёрные точки) после активации тромбоцитов 100 мкг/мл фукоидана

Для определения управляющих параметров модели был проведен анализ чувствительности, при котором ответ модели оценивался по концентрации активных Syk киназ или по концентрации ИФ₃. Параметры модуля «тирозинкиназы» оказали наибольшее влияние на все анализируемые

переменные. В частности, кинетические параметры Syk-киназы влияли на все ответы тромбоцитов. Среди параметров модуля «LAT-PLC γ 2» наиболее влиятельными параметрами были скорость дефосфорилирования LAT и начальная концентрация LAT, а также каталитические параметры киназы Vtk. Относительная чувствительность анализируемых ответов к параметрам модуля «кластеризация CLEC-2» была наименьшей. Анализ локальной чувствительности также позволил идентифицировать три реакции, ограничивающие скорость: активацию киназы Syk, фосфорилирование LAT и образование кластера CLEC-2.

Для проверки предсказания модели о значимости процесса кластеризации рецепторов для CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах была проведена серия экспериментов. Известно, что диффузия белков в мембранах тромбоцитов зависит от температуры окружающей среды: $D = D_0 e^{-E_{Arr}/RT}$, где D – коэффициент диффузии, E_{Arr} – энергия активации реакции, R – универсальная газовая постоянная, T – температура в Кельвинах. Следовательно, изменение температуры может повлиять на скорость кластеризации рецепторов.

Для проверки данной гипотезы были проведены эксперименты по анализу общего уровня фосфорилирования аминокислотных остатков тирозина в выделенных из цельной крови тромбоцитах при их активации через рецептор CLEC-2. В качестве активатора было использовано 100 мкг/мл фукоидана. Через 15-30-60-90-120-150-180-300 секунд после активации реакция была остановлена. Эксперименты проводились при 25°C (рис. 6А) и при 37°C (рис. 6Б). Было получено, что при более высокой температуре наблюдается ускорение и усиление фосфорилирования в тромбоцитах (рис. 6В).

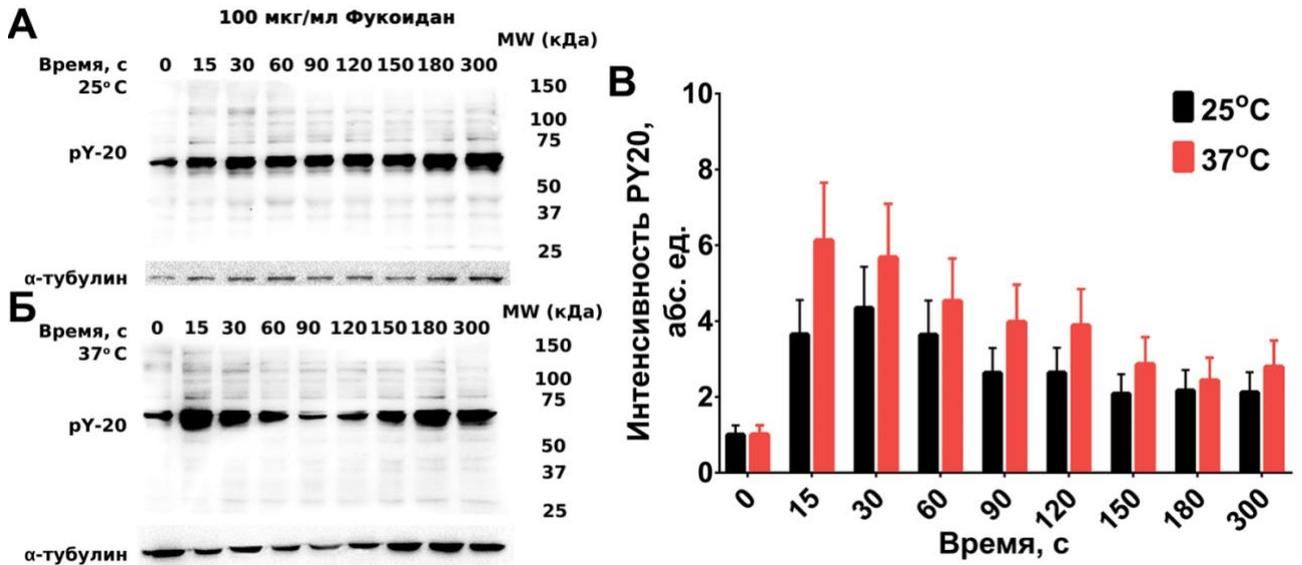


Рисунок 6 – Вестерн-блот анализ фосфорилирования аминокислотных остатков тирозина (с помощью антител pY20) в тромбоцитах, активированных 100 мкг/мл фукоидана. А,Б – Фосфорилирование тирозина при 25°C (А) и при 37°C (Б). В – Количественное сравнение динамики фосфорилирования тирозинов в тромбоцитах в ответ на активацию фукоиданом при различных температурах. Приведены типичные результаты из n=3 здоровых доноров

Изменение концентрации мембранного холестерина в мембранах тромбоцитов является ещё одним способом повлиять на кластеризацию мембранных белков. Инкубация тромбоцитов с метил-β-циклодекстрином (mβCD) приводит к обеднению мембран по холестерину. Для исследования влияния температуры и mβCD на формирование кластеров рецепторов CLEC-2 и на сборку LAT-сигналом была использована флуоресцентная микроскопия одиночных тромбоцитов при окраске антителами к P-LAT (рис. 7А). Снижение температуры с 37°C до 25°C, а также пре-инкубация тромбоцитов с mβCD приводила к нарушению формирования сигналом, а также значительному замедлению активации тромбоцитов (рис. 7Б, точки). Варьирование параметров кластеризации рецепторов CLEC-2 в модели позволило описать полученные экспериментальные данные (рис. 7Б, сплошные линии).

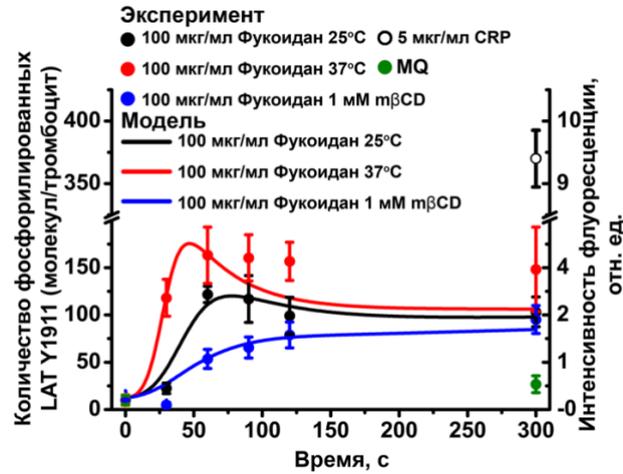


Рисунок 7 – Результаты иммунофлуоресцентного анализа формирования LAT-сигналысомы в различных условиях в одиночных тромбоцитах. Приведены экспериментальные данные $n=5$ здоровых доноров. 5 мкг/мл CRP и деионизированная вода (MQ) были использованы как положительный и отрицательный контроль, соответственно (разработан автором)

Одним из предсказаний построенной модели была инициация кальциевой сигнализации в тромбоцитах в ответ на активацию CLEC-2. Для обоих паттернов кластеризации рецепторов (рис. 3) модель предсказывала наработку достаточного количества ФЛС γ 2 для инициации кальциевого ответа в тромбоцитах (рис. 8А). С помощью проточной цитометрии тромбоцитов, загруженных кальций-чувствительным флуорофором Fura Red, было показано, что агонист CLEC-2 фукоидан вызывает повышение концентрации кальция в тромбоцитах. Более того, CLEC-2 индуцированная кальциевая сигнализация в тромбоцитах также оказалась зависимой от температуры окружающей среды и насыщения мембраны тромбоцитов холестерином (рис. 8Б).

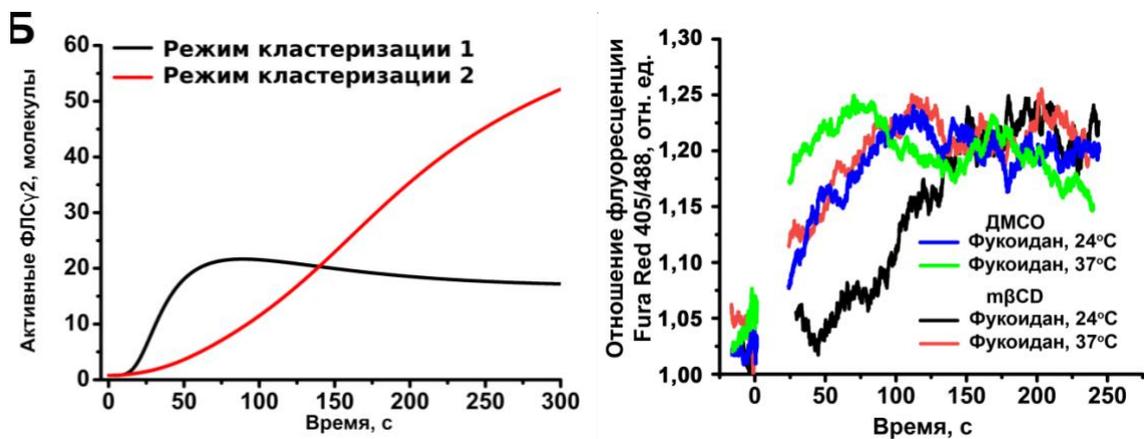


Рисунок 8 – Кальциевая сигнализация в тромбоцитах в ответ на активацию CLEC-2. А. – Сравнение предсказаний модели по влиянию паттернов кластеризации CLEC-2 на активацию

ФЛСγ2. Б. - Кальциевые ответов тромбоцитов при 24°C и при 37°C в отсутствие (ДМСО) или в присутствии mβCD (mβCD). Приведены типичные данные одного из для n=3 здоровых доноров.

После того как было проведено исследование особенностей CLEC-2 индуцированной кальциевой сигнализации в тромбоцитах, разработанная для этих целей модель CLEC-2 была преобразована в модель рецепторов GPVI. Основные отличия между рецепторами CLEC-2 и GPVI находятся на начальных стадиях активации тромбоцитов через данные сигнальные пути. Из литературы известно, что количество рецепторов GPVI на тромбоцитах составляет не менее 5000 копий на клетку, в то время как рецепторов CLEC-2 только 2000 копий на клетку. Более того, за счёт ассоциации GPVI с FcγR-цепью несущей две последовательности YxxL, для активации Syk киназ одна молекула GPVI может активировать одну молекулу Syk. В цитоплазматическом домене CLEC-2 есть только одна последовательность YxxL, поэтому для активации одной молекулы Syk необходимо 2 молекулы CLEC-2. Также показано, что в то время как CLEC-2 фосфорилируется небольшими количествами активных Syk, присутствующих в покое тромбоцитах, фосфорилирование GPVI проводится за счёт активных SFK, которых в покое тромбоцитах заметно больше благодаря активности фосфатаз CD148. Основные различия в сигнальных каскадах приведены на Рисунке 9.

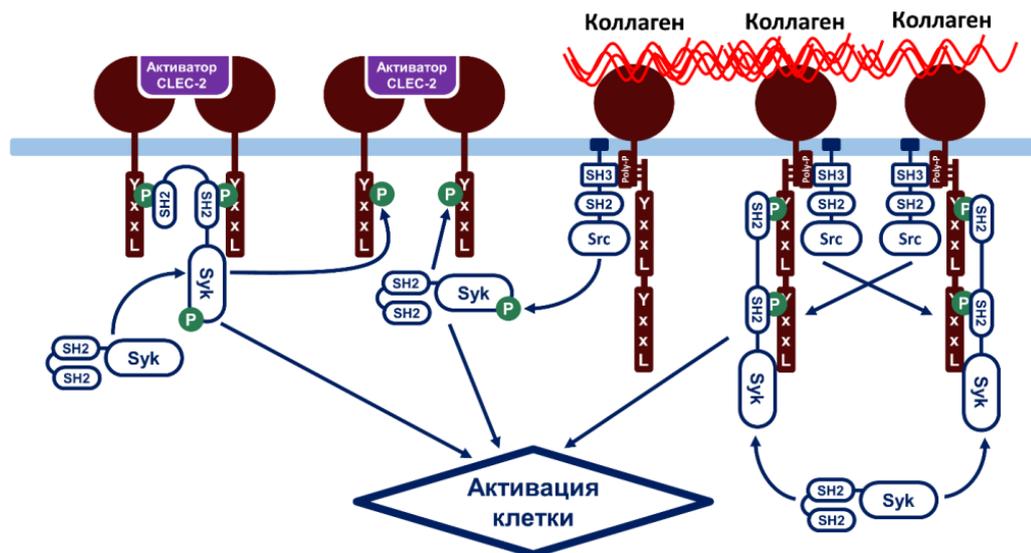


Рисунок 9 – Сравнение начальных стадий активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и GPVI: ключевым различием между рецепторами является то, что рецептор CLEC-2 фосфорилируется тирозинкиназами Syk, а рецептор GPVI – тирозинкиназами SFK

После преобразования модели CLEC-2 в модель GPVI неизвестные параметры (дефосфорилирование GPVI, а также константы ассоциации Syk и GPVI) были подобраны на основании доступных из литературы экспериментальных данных (рис. 10А). Также было проведено сопоставление предсказываемой моделью концентрации кальция в тромбоцитах и концентрации, полученной экспериментально (рис. 10Б).

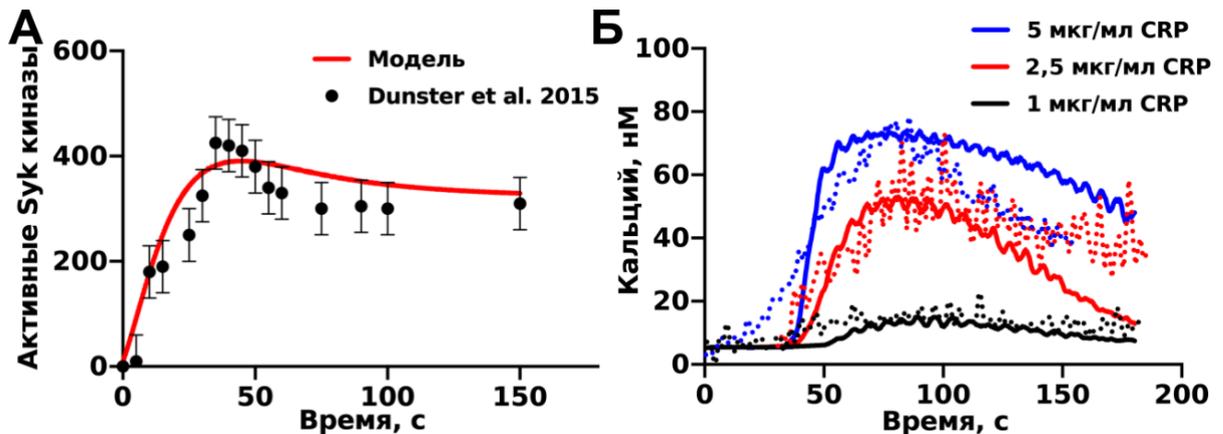


Рисунок 10 – Сравнение результатов работы модели GPVI и экспериментальных данных. А – Предсказываемое моделью количество активных Syk киназ (красная кривая), сопоставленное с данными из литературы (чёрные точки). Б – Средняя концентрация кальция в тромбоцитах в ответ на активацию их 5 (синие кривые), 2,5 (красные кривые) и 1 (чёрные кривые) мкг/мл CRP: точки – эксперимент, кривые – теоретический расчёт

Глава 4 посвящена экспериментальному исследованию тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах здоровых доноров и пациентов.

Для анализа тромбоциты здоровых доноров в цельной крови были окрашены кальций-чувствительным флуорофором Fura Red, а затем проанализированы на проточном цитометре BD FACS Canto II. Концентрация кальция была получена из данных по флуоресценции Fura Red при пересчёте по формуле Гринкевича. Дополнительно была проведена нормировка концентрации кальция на известную концентрацию свободного кальция при известных фиксированных общей концентрации кальция, концентрации EGTA, pH и температуре. Данным методом было получено, что среди здоровых доноров в возрасте от 18 до 35 лет присутствует значительная вариабельность по максимальной достижимой концентрации кальция в ответ на стимуляцию 5 мкг/мл CRP (рис. 11А). Значимость наблюдаемых различий исчезала при уменьшении концентрации CRP. Различия в ответах именно на максимальную

активацию могут свидетельствовать о существовании вариабельности количества рецепторов GPVI на тромбоцитах здоровых доноров. Действительно, модель предсказала значительную зависимость кальциевых ответов тромбоцитов на активацию GPVI от количества рецепторов, в особенности, в области известных физиологических количеств рецепторов GPVI на тромбоцитах (3000–6000 копий на клетку, рис. 11Б).

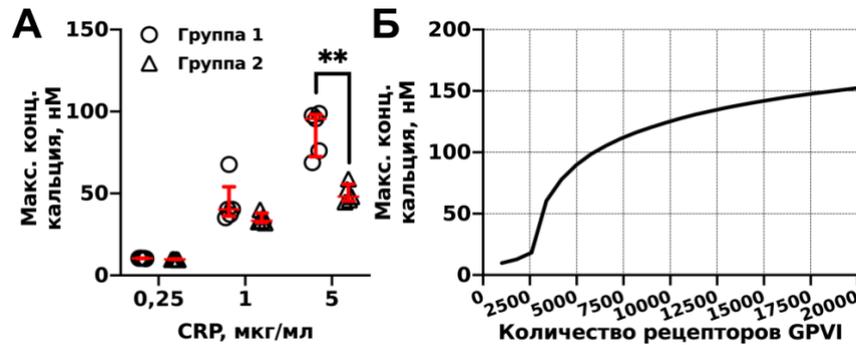


Рисунок 11 – Кальциевая сигнализация в тромбоцитах здоровых доноров в ответ на стимуляцию их CRP. А – Максимальные концентрации кальция в тромбоцитах здоровых доноров с сильным (группа 1, n=5 доноров) и слабым (группа 2, n=5 доноров) ответом на активацию. Б – Зависимость максимальной концентрации кальция, предсказываемой моделью GPVI-индуцированной сигнализации в тромбоцитах, от количества рецепторов GPVI на тромбоцитах. ** - соответствует $p < 0,01$ по критерию Манна-Уитни

Наконец, было проведено исследование кальциевой сигнализации в тромбоцитах пациентов с КГЭ. Было получено, что у пациентов наблюдается значимое снижение ответов тромбоцитов на стимуляцию их 200 нМ агониста CLEC-2 родоцитина (рис. 12А). С помощью модели было сделано предсказание, что данные различия могут быть объяснены снижением количества рецепторов CLEC-2 на поверхности тромбоцитов (рис. 12Б). Таким образом, можно предположить, что в области опухоли происходит фильтрация тромбоцитов: тромбоциты с нормальным количеством CLEC-2 на поверхности остаются в опухоли, в то время как в кровотоке остаются только тромбоциты со сниженным количеством CLEC-2.

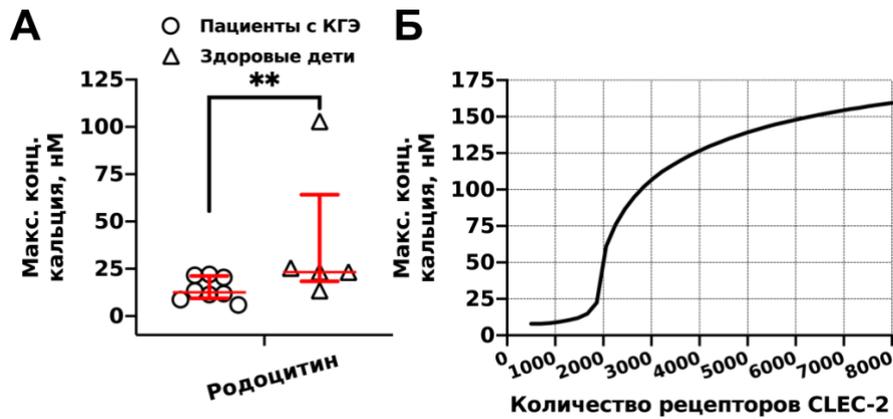


Рисунок 12 – Кальциевая сигнализация в тромбоцитах пациентов с КГЭ. А – Сравнение максимальной концентрации кальция в тромбоцитах пациентов с КГЭ (круги) и тромбоцитах здоровых педиатрических доноров (треугольники). Б – Зависимость максимальной концентрации кальция, предсказываемой моделью CLEC-2-индуцированной сигнализации в тромбоцитах, от количества рецепторов CLEC-2 на тромбоцитах. ** - соответствует $p < 0.01$ по критерию Манна-Уитни

В **заключении** описана значимость полученных результатов для понимания фундаментальных механизмов функционирования тромбоцитов, а также для исследования механизмов нарушений тромбоцитарного гемостаза при различных онкогематологических заболеваниях.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Теоретически предсказано и экспериментально подтверждено, что кластеризация рецепторов в мембранах тромбоцитов наравне с активацией тирозинкиназ и формированием LAT-сигналысомы является скоростью-лимитирующей стадией для CLEC-2-индуцированной сигнализации в тромбоцитах. Также получено, что нарушение процесса кластеризации рецепторов может замедлять активацию тромбоцитов более чем на 200 секунд.
2. Показано, что активация тромбоцитов через рецептор CLEC-2 зависит от температуры и от концентрации холестерина в мембранах тромбоцитов: уменьшение температуры на 10 градусов замедляло активацию тромбоцитов через CLEC-2 на 30 ± 10 секунд, а обеднение мембраны по холестерину дополнительно замедляло активацию на 40 ± 20 секунд.
3. Показано, что мобилизация кальция в тромбоцитах здоровых доноров в ответ на высокие концентрации агониста рецептора GPVI могут отличаться в 1.5–2

раза, предположительно, по причине вариабельности количества рецепторов GPVI у этих доноров.

4. CLEC-2-индуцированная активация тромбоцитов пациентов с КГЭ ослаблена, предположительно, по причине снижения количества этих рецепторов на поверхности тромбоцитов пациентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пантелеев, М.А. Тромбоциты и гемостаз / М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова // Онкогематология. – 2014. – Т. 9 – № 2 – С. 65–73.
2. Poulter, N.S. Clustering of glycoprotein VI (GPVI) dimers upon adhesion to collagen as a mechanism to regulate GPVI signaling in platelets / N.S. Poulter, A.Y. Pollitt, D.M. Owen, E.E. Gardiner, R.K. Andrews, H. Shimizu, D. Ishikawa, D. Bihan, R.W. Farndale, M. Moroi, S.P. Watson, S.M. Jung // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH.* – 2017. – Vol. 15 – № 3 – P. 549–564.
3. Johnson, E.N. Increased platelet sensitivity to ADP in mice lacking platelet-type 12-lipoxygenase / E.N. Johnson, L.F. Brass, C.D. Funk // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. – Vol. 95 – № 6 – P. 3100–3105.
4. Rayes, J. Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2 / J. Rayes, S.P. Watson, B. Nieswandt // *The Journal of Clinical Investigation.* – 2019. – Vol. 129 – № 1 – P. 12–23.
5. Hughes, C.E. The N-terminal SH2 domain of Syk is required for (hem)ITAM, but not integrin, signaling in mouse platelets / C.E. Hughes, B.A. Finney, F. Koentgen, K.L. Lowe, S.P. Watson // *Blood.* – 2015. – Vol. 125 – № 1 – P. 144–154.
6. Dhanjal, D.T.S. Minimal regulation of platelet activity by PECAM-1 / D.T.S. Dhanjal, E.A. Ross, J.M. Auger, O.J.T. Mccarty, C.E. Hughes, Y.A. Senis, S.P. Watson // *Platelets.* – Taylor & Francis, 2007. – Vol. 18 – № 1 – P. 56–67.
7. O’Rafferty, C. Kasabach–Merritt syndrome, kaposiform haemangioendothelioma and platelet blockade / C. O’Rafferty, G.M. O’Regan, A.D. Irvine, O.P. Smith // *British Journal of Haematology.* – 2015. – Vol. 171 – № 1 – P. 11–11.
8. Pollitt, A.Y. Syk and Src family kinases regulate C-type lectin receptor 2 (CLEC-2)-mediated clustering of podoplanin and platelet adhesion to lymphatic endothelial cells / A.Y. Pollitt, N.S. Poulter, E. Gitz, L. Navarro-Nuñez, Y.-J. Wang, C.E. Hughes, S.G. Thomas, B. Nieswandt, M.R. Douglas, D.M. Owen, D.G. Jackson, M.L. Dustin, S.P. Watson // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2014. – Vol. 289 – № 52 – P. 35695–35710.
9. Watson, S.P. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity / S.P. Watson, J.M.J. Herbert, A.Y. Pollitt // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH.* – 2010. – Vol. 8 – № 7 – P. 1456–

1467.

10. Balabin, F.A. Computational biology analysis of platelet signaling reveals roles of feedbacks through phospholipase C and inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase in controlling amplitude and duration of calcium oscillations / F.A. Balabin, A.N. Sveshnikova // *Mathematical Biosciences*. – 2016. – Vol. 276 – P. 67–74.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Martyanov, A.A.** Control of Platelet CLEC-2-Mediated Activation by Receptor Clustering and Tyrosine Kinase Signaling / A.A. Martyanov, F.A. Balabin, J.L. Dunster, M.A. Panteleev, J.M. Gibbins, A.N. Sveshnikova // *Biophysical Journal*. – 2020. – Vol. 118 – № 11 – P. 2641–2655. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.04.023> (Scopus: 3.54; WOS: 3.854).
2. Garzon Dasgupta, A.K. Development of a Simple Kinetic Mathematical Model of Aggregation of Particles or Clustering of Receptors / A.K. Garzon Dasgupta, **A.A. Martyanov**, A.A. Filkova, M.A. Panteleev, A.N. Sveshnikova // *Life*. – Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. – Vol. 10 – № 6 – P. 97. DOI: <https://doi.org/10.3390/life10060097> (Scopus: 1.9; WOS: 3.817)
3. **Martyanov, A.A.** Heterogeneity of Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Function in Pediatric Immune Thrombocytopenia Revealed by Continuous Flow Cytometry Analysis / A.A. Martyanov, D.S. Morozova, M.A. Sorokina, A.A. Filkova, D.V. Fedorova, S.S. Uzueva, E.V. Suntsova, G.A. Novichkova, P.A. Zharkov, M.A. Panteleev, A.N. Sveshnikova // *International Journal of Molecular Sciences*. – Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. – Vol. 21 – № 9 – P. 3035. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21093035> (Scopus: 5.838; WOS: 4.556)
4. Степанян, М.Г. Активация тромбоцитов через рецептор GPVI: варибельность ответа / М.Г. Степанян, А.А. Филькова, Гарсон Дасгупта А.к., **А.А. Мартьянов**, А.Н. Свешникова // *Биологические Мембраны*. – 2020. – Т. 37 – № 6. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0233475520060079> (РИНЦ: 0.949)
5. **Мартьянов, А.А.** CLEC-2-индуцированная внутриклеточная сигнализация в тромбоцитах крови / А.А. Мартьянов, В.Н. Канева, М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова // *Биомедицинская химия*. – НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 2018. – Т. 64 – № 5 – С. 387–396. DOI: <https://doi.org/10.18097/PBMC20186405387>. (РИНЦ: 0.27)
6. **Мартьянов, А.А.** Компьютерное моделирование внутриклеточной сигнализации при активации тромбоцитов крови фукоиданом / А.А. Мартьянов, Ф.А. Балабин, А.С. Майоров, Е.В. Шамова, М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова // *Биологические Мембраны*. – 2018. – Т. 35 – № 5. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0233475518040102> (РИНЦ: 0.949)
7. **Мартьянов, А.А.** Физиологические и патофизиологические аспекты активации тромбоцитов крови через рецептор CLEC-2 / А.А. Мартьянов, В.Н. Канева, М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова // *Онкогематология*. – 2018. – Т. 13 – № 3 – С. 83–90. DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2018-13-3-83-90> (РИНЦ: 0.585)