

На правах рукописи

Артёменко Елена Олеговна

Взаимодействие адгезионных трансмембранных гликопротеинов с
цитоскелетом в субпопуляциях активированных тромбоцитов

03.01.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2017.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук»

Научный руководитель: доктор физико-математических наук
Пантелеев Михаил Александрович

Официальные оппоненты: **Розенфельд Марк Александрович**
доктор биологических наук, профессор,
Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля Российской академии
наук, заведующий лабораторией
Литвинов Рустем Игоревич
доктор медицинских наук, профессор,
Институт фундаментальной медицины
и биологии Казанского федерального
университета, заведующий лабораторией

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «19» октября 2017 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ и на сайте www.ibmc.msk.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного
совета, кандидат
химических наук



Карпова Елена
Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Тромбоциты являются важным компонентом системы гемостаза. Их адгезионные и агрегационные свойства являются ключевыми для прикрепления к поврежденной стенке сосуда и взаимодействия друг с другом при формировании тромба. Они реализуются специализированными мембранными гликопротеинами (интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$, гликопротеин Ib и др.), которые взаимодействуют с рядом цитоскелетных белков, обеспечивающих их прикрепление к актиновым филаментам [Platelets, thrombosis and the vessel wall, Berndt, 2000, CRC Press]. Прикрепление адгезионных гликопротеинов к цитоскелету важно для передачи сигнала от внешнего окружения внутрь клетки [Qiu et al. PNAS, 2014;111:14430-14435.]

При физиологической агонист-индуцируемой активации тромбоцитов происходит формирование ими двух субпопуляций с принципиально различными свойствами, одна из них содержит на внешней мембране фосфатидилсерин (ФС), в то время как другая нет [Dale et al.. Nature, 2002;415:175-179]. ФС-отрицательная субпопуляция хорошо агрегирует и адгезирует к поверхности, в то время как ФС-положительная плохо агрегирует и адгезирует, однако обладает значительно большей прокоагулянтной активностью, за счет того, что появление на ее мембране ФС обеспечивает гораздо более эффективное связывание факторов свертывания и приводит к значительному ускорению скорости реакций свертывания в 10^3 - 10^5 раз [Mann et al., Blood, 1990;76:1-16].

При активации тромбоцита происходит кардинальная перестройка его цитоскелета: ФС-отрицательные тромбоциты характеризуются множественными филоподиями, в то время как ФС-положительная субпопуляция представляет собой округленную баллон-подобную структуру без филоподий. Прикрепление мембранных гликопротеинов к цитоскелету в этих субпопуляциях не исследовано, хотя показана корреляция между экспозицией ФС на мембране тромбоцита и деградацией ряда цитоскелетных белков. Неизвестными остаются также механизмы, управляющие

прикреплением гликопротеинов к цитоскелету, равно как и связь влияния разрушения прикрепления ключевых адгезионных белков к цитоскелету на адгезионные свойства тромбоцитов.

Цель работы: исследование прикрепления ключевых адгезионных мембранных гликопротеинов (интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$, гликопротеина Ib и P-селектина) к цитоскелету тромбоцитов в субпопуляциях тромбоцитов и связи между прикреплением мембранных гликопротеинов к цитоскелету и адгезивными свойствами тромбоцитов.

Задачи исследования:

1. Разработать методику, позволяющую анализировать прикрепление мембранных белков к цитоскелету в субпопуляциях клеток.
2. Исследовать прикрепление адгезионных мембранных белков к цитоскелету в неактивированных и субпопуляциях активированных тромбоцитов.
3. Исследовать влияние деградации цитоскелетных белков на прикрепление адгезионных мембранных белков к цитоскелету в субпопуляциях активированных тромбоцитов.
4. Исследовать механизмы, контролируемые прикрепление адгезионных мембранных белков к цитоскелету в субпопуляциях активированных тромбоцитов.
5. Исследовать влияние деградации цитоскелетных белков, обеспечивающих прикрепление адгезионных мембранных гликопротеинов к цитоскелету, на адгезионные свойства тромбоцитов.

Научная новизна. Разработан подход, основанный на анализе флуоресценции мембранных гликопротеинов на поверхности фиксированной клетки до и после ее обработки детергентом, с помощью которого возможен анализ прикрепления к цитоскелету мембранных белков в субпопуляциях клеток, разделяемых с помощью проточной цитометрии. С использованием разработанного подхода показано прикрепление основных адгезионных мембранных гликопротеинов тромбоцита (интегрин

$\alpha_{IIb}\beta_3$, гликопротеин Ib и Р-селектин) к цитоскелету тромбоцитов в неактивированных и ФС-отрицательной субпопуляции активированных тромбоцитов и показано, что это прикрепление разрушено только в субпопуляции ФС-положительных активированных тромбоцитов. Показано, что основным механизмом, контролирующим разрушение прикрепления адгезионных белков к цитоскелету, является деградация ряда цитоскелетных белков, задействованных в прикреплении мембранных гликопротеинов к цитоскелету, протекающая в ФС-положительных тромбоцитах в результате активации кальций-зависимой протеазы кальпаина. Выявлено, что разрушение прикрепления мембранных гликопротеинов к цитоскелету влияет на адгезионные свойства тромбоцитов в условиях потока.

Научно-практическим значением результатов данной работы является вклад в понимание свойств субпопуляций активированных тромбоцитов и их физиологической роли в формировании тромба.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработан новый подход с использованием проточной цитометрии, который позволяет анализировать прикрепление мембранных белков к цитоскелету клетки.
2. В неактивированных и субпопуляции активированных ФС-отрицательных тромбоцитов ключевые адгезионные белки (интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ и гликопротеин Ib) прикреплены к цитоскелету клетки, в то время как в субпопуляции ФС-положительных тромбоцитов связь между адгезионными гликопротеинами и цитоскелетом разрушена.
3. Разрушение прикрепления мембранных адгезионных белков к цитоскелету происходит в результате протеолитической деградации ряда цитоскелетных белков (таких как филамин и талин), которые участвуют в прикреплении мембранных белков к цитоскелету тромбоцитов, протекающей в ФС-положительных тромбоцитах.
4. Основным механизмом, который контролирует разрушение прикрепления мембранных гликопротеинов к цитоскелету в ФС-положительных тромбоцитах, является перестройка

цитоскелета тромбоцита в результате активации кальций-зависимой протеазы кальпаина.

5. Слабая сопротивляемость потоку ФС-положительных тромбоцитов (открепляются от иммобилизованного фибриногена при скорости сдвига около 500 c^{-1}) объясняется перестройкой их цитоскелета в результате активации кальпаина, поскольку предварительно проинкубированные с ингибитором кальпаина такие тромбоциты обладают значительно большей сопротивляемостью потоку (способны удерживаться на подложке даже при скорости сдвига порядка 9000 c^{-1}).

Апробация работы.

Результаты диссертационной работы были представлены на 36th FEBS Congress (Torino, Italy, 25-30 June, 2011), XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (Kyoto, Japan, 23-28 July, 2011), международной конференции Programmed Cell Death in Biology and Medicine, (Moscow, Russia, 4-5 June, 2012), 1st EUPLAN Platelet Conference (Maastricht, Netherlands, Sep 19-21, 2012), 6-ой Всероссийской конференции «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии», Москва, 31 января-2 февраля 2013), XXIV Congress of the International society on Thrombosis and Haemostasis (Amsterdam, Netherlands, June 29 - July 4, 2013), II Конгрессе гематологов России (Москва, Россия, 17-19 апреля, 2014), FEBS-EMBO 2014 Conference (Paris, France, 30 August – 4 September, 2014), International conference on bioorganic chemistry, biotechnology and bionanotechnology (Москва, Россия, 15-19 сентября, 2014), XXV Congress of the International society on Thrombosis and Haemostasis (Toronto, Canada, June 20–25, 2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 18 публикаций. Статей в международных и российских рецензируемых журналах – 6; публикаций в трудах конференций и съездов – 12.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 105 страницах машинописного текста, состоит из введения, четырех

глав (главы 1 – обзора литературы, главы 2 – описания результатов, главы 3 – обсуждения результатов, главы 4 – описания материалов и методов), выводов и библиографического указателя, включающего 183 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении показана актуальность исследуемой темы, сформулированы цели и задачи исследования, дана общая характеристика работы.

Глава 1 посвящена обзору литературы. Рассмотрены тромбоциты, как ключевые участники процесса свертывания крови, гетерогенность активированных тромбоцитов и их разделение на субпопуляции, свойства субпопуляций активированных тромбоцитов. Изложены представления об адгезии и агрегации тромбоцитов, участие цитоскелета тромбоцитов в этих процессах. Детально рассмотрено прикрепление адгезионных мембранных белков к цитоскелету клеток и его роль в адгезии тромбоцитов.

В главе 2 описаны материалы и методы, использованные в работе. Помимо специфических методов, использованных в работе и описанных ниже, в главе 2 приведены все реактивы, использовавшиеся при проведении экспериментов, описана методика выделения тромбоцитов из крови здоровых доноров с помощью центрифугирования крови и очистка тромбоцитов от белков плазмы с использованием гель-фильтрации.

Материалы и методы

Активация тромбоцитов

Выделенные из крови с помощью центрифугирования и гель-фильтрации тромбоциты в буфере А (20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 0,4 мМ NaH₂PO₄, 5 мМ глюкоза, 0,5% бычий сывороточный альбумин (БСА), pH 7,4) в концентрации 50000/мкл активировали добавлением тромбина, смеси тромбина и коллаген-подобного пептида (collagen-related peptide, CRP) или кальциевого ионофора A23187 при комнатной температуре в присутствии 2,5 мМ CaCl₂.

Проточная цитометрия

Тромбоциты инкубировали с флуоресцентно-мечеными антителами к интегрину $\alpha_{IIb}\beta_3$, гликопротеину Ib и P-селектину (CD61, CD42b и CD62P, соответственно). Разделение тромбоцитов на ФС-положительную и ФС-отрицательную субпопуляции осуществляли окрашиванием либо флуоресцентно-меченым аннексином V (детектирует ФС на внешней мембране клетки) либо антителами к активной форме интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ PAC1 (активная форма интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ отсутствует на ФС-положительной субпопуляции тромбоцитов). Тромбоциты анализировали с помощью проточного цитометра FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, США) или Accuri C6 (Accuri Cytometers, BD Biosciences, San Jose, CA, США). Компенсация была применена для всех видов двухцветного анализа. Полученные данные обрабатывали с помощью программы WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, США) или CFlow (Accuri Cytometers), соответственно.

Фиксация тромбоцитов и обработка детергентом

Окрашенные антителами тромбоциты фиксировали параформальдегидом и затем обрабатывали неионным детергентом Тритоном X-100.

Электрофорез белков

Одномерный денатурирующий электрофорез белков в полиакриламидном геле был проведен согласно Laemmli [Laemmli, Nature, 1970;227:680-685]. Белки в геле визуализировали окрашиванием либо Кумасси либо серебром. Для всех экспериментов, где был проведен электрофорез, тромбоциты очищали гель-фильтрацией в буфере А без добавления БСА и активировали агонистами в этом же буфере.

Сортировка клеток

Активированные и окрашенные флуоресцентно-меченым аннексином V тромбоциты анализировали и разделяли на ФС-положительную и ФС-отрицательную субпопуляции с использованием системы для сортировки клеток BD FACSAria II (BD Biosciences, San Jose, CA, США). Сортировка выполнена в институте иммунологии РАН Пичугиным А.В.

Конфокальная микроскопия

Тромбоциты на подложке визуализировали с помощью конфокального микроскопа Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Jena, Германия) со 100x объективом. Для обработки полученных изображений использовали программу ImageJ. Съемка на конфокальном микроскопе выполнена н.с. ЦТП ФХФ РАН Якименко А.О.

Анализ прикрепления мембранных гликопротеинов к цитоскелету с помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии

В качестве подложки для иммобилизации тромбоцитов использовали фибриноген, нанесенный на покровное стекло. Тромбоциты инкубировали с фибриногеновой подложкой, затем проточную камеру промывали буфером А при 100 с^{-1} для удаления несвязавшихся с подложкой тромбоцитов. Иммобилизованные тромбоциты активировали 100 нМ тромбина и 10 мкг/мл CRP и окрашивали аннексином V конъюгированным с Алексой Флуор 647 (для визуализации ФС-положительных тромбоцитов) и CD61–флуоресцеинизотиоционатом (ФИТЦ) или CD42b–ФИТЦ (для визуализации мембранных гликопротеинов интегрина $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, или гликопротеина Ib, соответственно). Затем тромбоциты фиксировали параформальдегидом и обрабатывали раствором Тритона X-100.

Спротивляемость тромбоцитов откреплению от подложки в условиях потока

В качестве подложки для иммобилизации тромбоцитов использовали фибриноген, нанесенный на покровное стекло. Тромбоциты окрашивали CD61 конъюгированным с Алексой Флуор 647, затем инкубировали с фибриногеновой подложкой в отсутствие потока. После этого проточную камеру промывали буфером А при 100 с^{-1} для удаления несвязавшихся с подложкой тромбоцитов и прикрепившиеся к подложке тромбоциты инкубировали еще до их полного распластывания на иммобилизованном на стекло фибриногене. Иммобилизованные тромбоциты инкубировали либо с 0,2% диметилсульфоксидом (ДМСО) в качестве контроля либо с 200 мкМ ингибитором кальпаина MDL28170 добавленным из стока, растворенного в

ДМСО. После этого тромбоциты активировали A23187 в присутствии 2,5 мМ хлорида кальция и окрашивали аннексин V–ФИТЦ для визуализации ФС-положительных тромбоцитов. Затем тромбоциты подвергали воздействию потока с постепенно увеличивающейся скоростью сдвига: 300, 500, 1000, 1500, 2000, 4000, 6000, 9000 с⁻¹ и визуализировали конфокальной микроскопией.

Анализ способности тромбоцитов прикрепляться к подложке
Фактор фон Виллебранда был иммобилизован на покрывное стекло. Тромбоциты были проинкубированы с 0,2% ДМСО в качестве контроля либо с ингибитором кальпаина MDL28170 добавленным из стока, растворенного в ДМСО. Затем тромбоциты инкубировали с CD61 конъюгированным с Алексой Флуор 647, активировали A23187 в присутствии 2,5 мМ хлорида кальция и пропускали через проточную камеру при скорости сдвига 100 с⁻¹. Затем проточную камеру промывали от несвязавшихся с подложкой тромбоцитов буфером А и прикрепившиеся тромбоциты визуализировали конфокальной микроскопией.

Статистика

Все эксперименты были проведены не менее трех раз с тромбоцитами от различных доноров. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение.

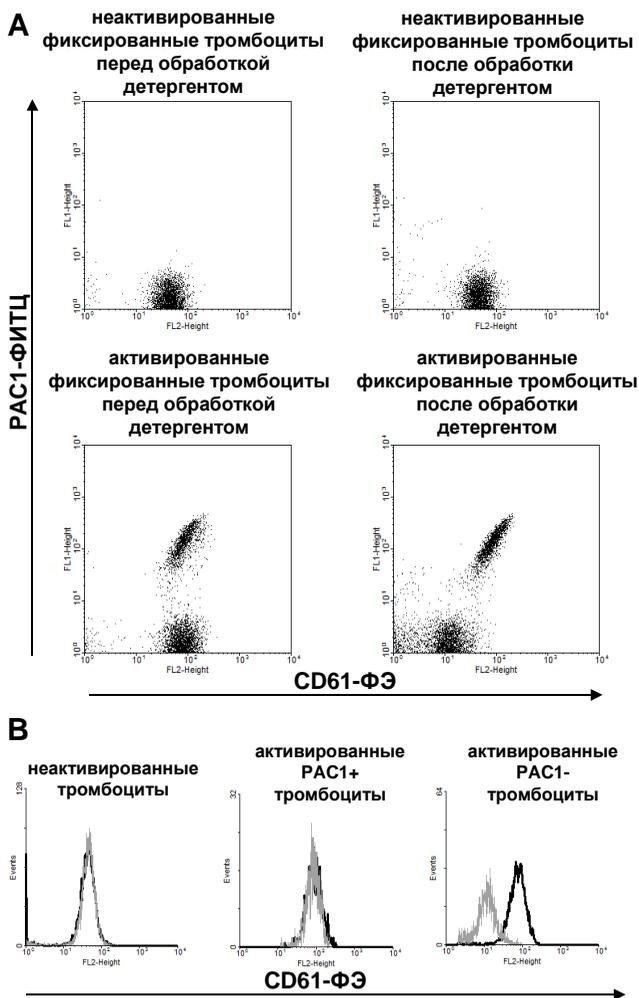


Рис. 1. Анализ прикрепления интегрина $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ к цитоскелету в субпопуляциях тромбоцитов. Неактивированные тромбоциты окрашивали CD61-ФЭ (10 мин), затем фиксировали, обрабатывали раствором Тритона X-100 и анализировали проточной цитометрией. Тромбоциты активировали добавлением тромбина (100 нМ) и CRP (10 мкг/мл) 20 мин, затем окрашивали одновременно двумя флуоресцентно-мечеными антителами PAC1-ФИТЦ и CD61-ФЭ (10 мин), фиксировали, обрабатывали раствором Тритона X-100 и анализировали проточной цитометрией. Представлены результаты типичного эксперимента (n=4). **A.** Приведены типичные дот-плоты фиксированных неактивированных и активированных тромбоцитов перед и после их обработки детергентом. **B.** Приведены типичные гистограммы флуоресценции фиксированных неактивированных и активированных PAC+(PAC1-положительных) и PAC-(PAC1-отрицательных) тромбоцитов перед (черным) и после (серым) их обработки детергентом.

Результаты и их обсуждение

Анализ прикрепления адгезионных мембранных гликопротеинов к цитоскелету в субпопуляциях активированных тромбоцитов

Для исследования прикрепления адгезионных мембранных гликопротеинов к цитоскелету тромбоцитов был разработан специальный подход. Данный подход основан на окрашивании тромбоцитов флуоресцентно-мечеными антителами к поверхностным мембранным белкам, фиксации окрашенных клеток и последующей обработки их раствором детергента для высвобождения из зафиксированных клеток мембранных гликопротеинов, связь которых с цитоскелетом разрушена. Аналогичный подход с фиксацией клеток и последующей обработкой их детергентом применяется при анализе ультраструктуры клеток с помощью электронной микроскопии [Hartwig et al., J. Cell Biol., 1991;112:407–425], кроме того, ранее было показано, что многие мембранные белки вымываются из фиксированных клеток в результате их обработки детергентом [Goldenthal et al., J. Histochem. Cytochem., 1985;33:813–820].

С помощью данного подхода было проанализировано прикрепление ключевых адгезионных белков тромбоцита (интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$, гликопротеин 1b и Р-селектин) к цитоскелету клетки. Было исследовано прикрепление адгезионных белков к цитоскелету клетки в неактивированных тромбоцитах и 2-х субпопуляциях активированных тромбоцитов (Рис. 1-3). Анализ дот-плотов флуоресценции неактивированных тромбоцитов, которые были окрашены флуоресцентно-мечеными антителами к интегрину $\alpha_{IIb}\beta_3$ (CD61-фикоэритрин (ФЭ)), затем зафиксированы и обработаны детергентом, показывает, что никакого различия во флуоресценции CD61 предварительно окрашенных фиксированных тромбоцитов до и после их обработки детергентом не выявлено (Рис.1). В то же время при анализе дот-плотов флуоресценции CD61 для ФС-положительных и ФС-отрицательных активированных тромбоцитов (ФС-положительные – это отрицательные по PAC1, и ФС-отрицательные – это положительные по PAC1) видно,

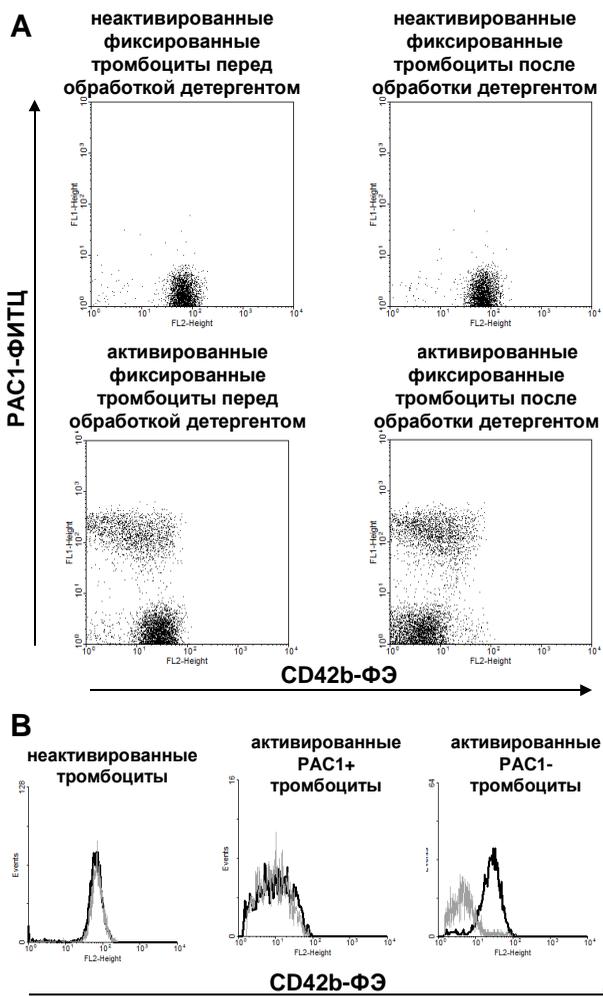


Рис. 2. Анализ прикрепления гликопротеина Ib к цитоскелету в субпопуляциях тромбоцитов. Неактивированные тромбоциты окрашивали CD42b-ФЭ (10 мин), затем фиксировали, обрабатывали раствором Тритона X-100 и анализировали проточной цитометрией. Тромбоциты активировали добавлением тромбина (100 нМ) и CRP (10 мкг/мл) 20 мин, затем окрашивали одновременно двумя флуоресцентно-мечеными антителами PAC1-ФИТЦ и CD42b-ФЭ (10 мин), фиксировали, обрабатывали раствором Тритона X-100 и анализировали проточной цитометрией. Представлены результаты типичного эксперимента (n=4). **A.** Приведены типичные дот-плоты фиксированных неактивированных и активированных тромбоцитов перед и после их обработки детергентом. **B.** Приведены типичные гистограммы флуоресценции фиксированных неактивированных и активированных PAC+(PAC1-положительных) и PAC-(PAC1-отрицательных) тромбоцитов перед (черным) и после (серым) их обработки детергентом.

что в случае ФС-положительных тромбоцитов происходит значительный сдвиг флуоресценции в область более низких значений после обработки предварительно окрашенных фиксированных тромбоцитов раствором детергента (Рис.1), в то же время для ФС-отрицательных активированных тромбоцитах такого сдвига флуоресценции CD61 не наблюдается (Рис.1). Дополнительный анализ гистограмм флуоресценции CD61 для неактивированных и субпопуляций активированных тромбоцитов показывает, что только в случае ФС-положительных активированных тромбоцитов наблюдается значительное различие в гистограммах флуоресценции CD61 предварительно окрашенных антителами к интегрину $\alpha_{IIb}\beta_3$ фиксированных тромбоцитов до и после их обработки детергентом (Рис.1). Для тромбоцитов, окрашенных флуоресцентно-мечеными антителами к гликопротеину Ib и P-селектину, были получены аналогичные результаты (Рис. 2 и Рис. 3).

На основании полученных данных о том, что только в ФС-положительных активированных тромбоцитах наблюдается значительное падение флуоресценции после обработки детергентом предварительно окрашенных антителами к мембранным гликопротеинам фиксированных клеток, было высказано предположение о том, что именно в ФС-положительных активированных тромбоцитах происходит практически полное разрушение связи, обеспечивающей прикрепление мембранных адгезионных белков к цитоскелету тромбоцитов. Из ранних исследований известно, что при определенных условиях активации тромбоцитов наблюдается деградация ряда цитоскелетных белков [Comfurius et al., Biochim. Biophys. Acta., 1985;815:143-148], в частности деградируют талин и филламин, белки цитоскелета, которые напрямую вовлечены в прикрепление адгезионных гликопротеинов к цитоскелету клетки. Для проверки гипотезы о том, что деградация цитоскелетных белков, обеспечивающих прикрепление мембранных белков к цитоскелету, может приводить к разрушения связи гликопротеинов с цитоскелетом, наблюдаемого нами с помощью проточной цитометрии, был исследован белковый профиль неактивированного тромбоцита и

его изменение при различных условиях активации тромбоцитов с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (данные приведены в тексте диссертации на с.46).

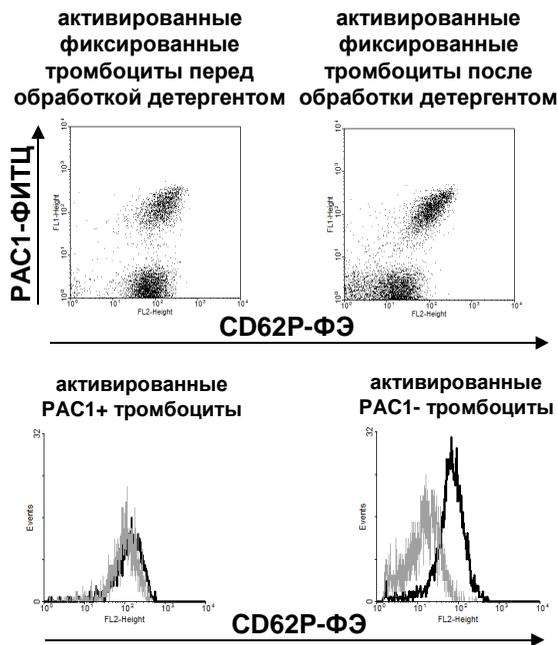


Рис. 3. Анализ прикрепления Р-селектина к цитоскелету в субпопуляциях тромбоцитов. Тромбоциты активировали добавлением тромбина (100 нМ) и CRP (10 мкг/мл) 20 мин, затем окрашивали одновременно двумя флуоресцентно-мечеными антителами PAC1-ФИТЦ и CD62P-ФЭ (10 мин), фиксировали, обрабатывали раствором неионного детергента Тритона X-100 и анализировали проточной цитометрией. Представлены результаты типичного эксперимента (n=4). Приведены дот-плоты фиксированных активированных тромбоцитов перед и после их обработки детергентом. Также приведены гистограммы флуоресценции фиксированных активированных PAC+(PAC1-положительных) и PAC-(PAC1-отрицательных) тромбоцитов перед (черным) и после (серым) их обработки детергентом.

Белковый профиль тромбоцита изменялся с изменением условий его активации: интенсивность полос, характерных для талина и миозина, падала с увеличением концентрации стимулирующих агонистов и одновременно появлялись белковые полосы, характерные для продуктов протеолитической деградации филамина и талина. Одновременный анализ активированных тромбоцитов с помощью проточной цитометрии показал, что

увеличение концентрации стимулирующих агонистов приводит к увеличению количества ФС-положительных тромбоцитов (данные приведены в тексте диссертации на с.46) и одновременно увеличивается деградация филамина и талина, которую мы детектировали с помощью электрофореза (данные приведены в тексте диссертации на с.46). Для дополнительного подтверждения того, что деградация филамина и талина происходит только в ФС-положительных тромбоцитах, был исследован статус цитоскелетных белков в субпопуляциях активированных тромбоцитов, которые были предварительно разделены с помощью сортировки клеток на проточном цитометре с функцией сортировки на ФС-положительную и ФС-отрицательную субпопуляции (Рис.4). В белковом профиле ФС-положительных тромбоцитов наблюдается отсутствие полос, характерных для филамина, талина и миозина, в то время как в белковом профиле субпопуляции

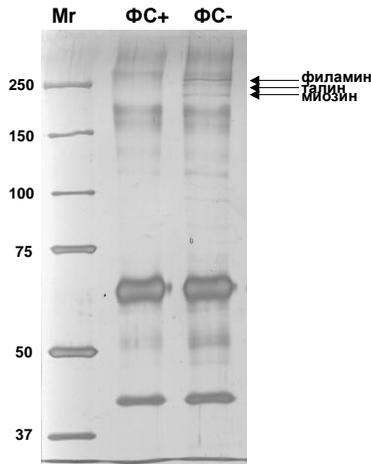


Рис. 4. Анализ деградации ряда цитоскелетных белков в субпопуляциях активированных тромбоцитов. Тромбоциты активировали 100 нМ тромбином и 10 мкг/мл CRP, затем с использованием сортера клеток разделяли на ФС-положительную (ФС+) и ФС-отрицательную (ФС-) субпопуляции (субпопуляции разделяли по их связыванию аннексина V). Равное количество ФС+ и ФС- тромбоцитов ($0,75 \times 10^6$ клеток) анализировали с использованием электрофореза, белки в геле визуализировали окрашиванием серебром. На рисунке приведены ФС+, ФС- субпопуляции и маркеры молекулярного веса (Mr, кДа).

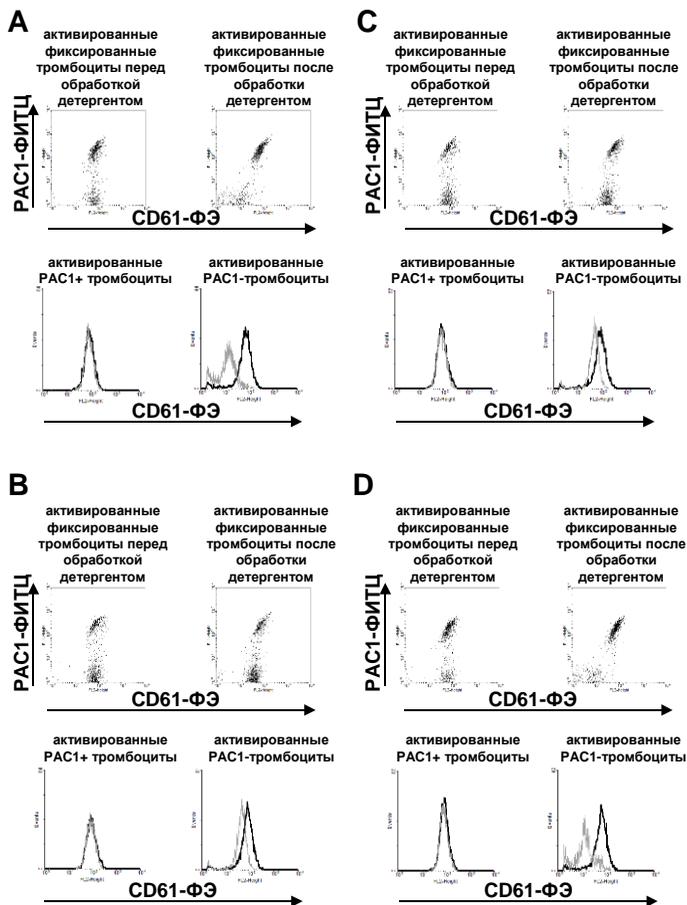


Рис. 5. Анализ влияния ингибиторов кальпайна на прикрепление интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ к цитоскелету в субпопуляциях активированных тромбоцитов. Тромбоциты проинкубировали 60 мин с 0,2% ДМСО в качестве контроля (А), 200 мкМ кальпептином (В), 200 мкМ MDL28170 (С), или 200 мкМ PD150606 (D), затем их активировали 100 нМ тромбином с 10 мкг/мл CRP (20 мин), окрашивали одновременно PAC1-ФИТЦ и CD61-ФЭ (10 мин), фиксировали, обрабатывали детергентом и анализировали проточной цитометрией. Приведены результаты типичного эксперимента ($n = 3$): дот-плоты активированных фиксированных тромбоцитов до и после их обработки детергентом и гистограммы флуоресценции CD61 для PAC1-положительных (PAC1+) и PAC1-отрицательных (PAC1-) активированных тромбоцитов перед (черным) и после (серым) их обработки детергентом.

ФС-отрицательных активированных тромбоцитов эти полосы присутствовали (Рис.4). Полученные результаты свидетельствуют о том, что деградация цитоскелетных белков, отвечающих за прикрепление мембранных гликопротеинов к цитоскелету клетки, наблюдается только в ФС-положительных активированных тромбоцитах.

В ранних работах было показано, что деградация филамина, талина и миозина опосредована активацией кальций-зависимой протеазы кальпаина [Verhallen et al., Biochim. Biophys. Acta, 1988;942:150–158]. Способность различных ингибиторов кальпаина влиять на деградацию данных цитоскелетных белков, протекающую при активации тромбоцитов, была исследована с помощью электрофореза. Тромбоциты предварительно проинкубировали с тремя разными ингибиторами кальпаина (кальпептин, MDL28170 и PD150606), затем активировали добавлением кальциевого ионофора A23187 (соединение, которое способно формировать почти 100% ФС-положительных тромбоцитов), после этого белковый профиль тромбоцитов анализировали с помощью электрофореза (данные приведены в тексте диссертации на с.54). Полученные результаты показали, что наиболее эффективными ингибиторами протеолиза филамина, талина и миозина являются кальпептин и MDL28170, в то время как PD150606 обладает значительно более слабой ингибирующей активностью.

Поскольку прикрепление мембранных гликопротеинов к цитоскелету клетки – это сложный процесс, который контролируется множеством специальных белков – неясно, насколько активация кальпаина и опосредованная ей деградация филамина и талина вовлечены в контроль прикрепления адгезионных мембранных гликопротеинов к цитоскелету. Для исследования того, насколько кальпаин влияет на разрушение прикрепления мембранных гликопротеинов к цитоскелету, был использован разработанный ранее метод, основанный на проточной цитометрии. Часть тромбоцитов перед активацией была проинкубирована с различными ингибиторами кальпаина, затем тромбоциты активировали, после этого тромбоциты окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами к интегрину $\alpha_{IIb}\beta_3$,

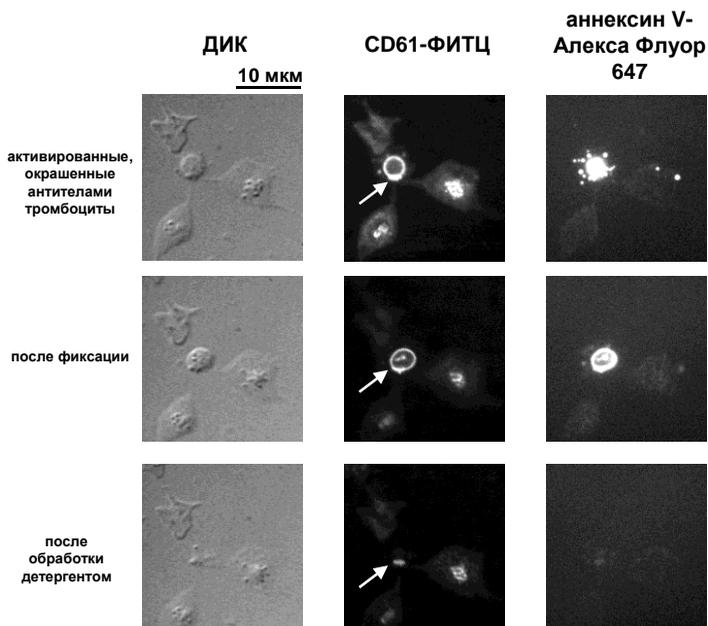


Рис. 6. Анализ разрушения прикрепления интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ к цитоскелету в субпопуляциях активированных тромбоцитов с помощью конфокальной микроскопии. Приведены типичные конфокальные изображения дифференциального интерференционного контраста (ДИК), ФИТЦ флуоресценции CD61 и Алекса Флуор 647 флуоресценции аннексина V для активированных тромбоцитов иммобилизованных на фибриноген после их окрашивания антителами, фиксации и обработки детергентом (n=3). Стрелкой указан баллон-подобный ФС-положительный тромбоцит и его домен на поверхности называемый «шапкой».

фиксируют и обрабатывают детергентом. В результате анализ дот-плотов и гистограмм флуоресценции CD61 для фиксированных тромбоцитов до и после их обработки детергентом показывает, что в присутствии таких ингибиторов кальпаина как кальпептин и MDL28170 разрушение связи мембранных гликопротеинов с цитоскелетом клетки значительно снижено, по сравнению с тромбоцитами, не проинкубированными с ингибиторами (Рис.5). Данные результаты предполагают, что основным механизмом, который контролирует разрушение связи мембранных гликопротеинов с цитоскелетом клетки, наблюдающееся в ФС-положительных активированных тромбоцитах, является активация кальций-зависимой протеазы кальпаина.

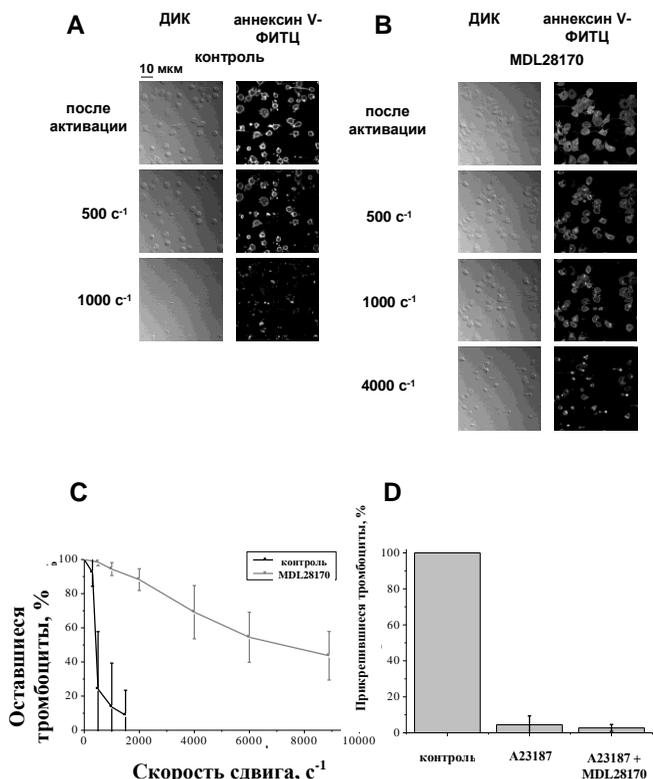


Рис. 7. Анализ способности **ФС**-положительных тромбоцитов удерживаться на подложке в условиях потока и прикрепляться к подложке в отсутствии и в присутствии ингибитора кальпаина **MDL28170**. Типичные конфокальные изображения **ДИК**, **ФИТЦ** флуоресценции аннексина **V** для активированных тромбоцитов проинкубированных с 0,2% **DMCO** в качестве контроля (**A**) или **MDL28170** (**B**), которые были иммобилизованы на фибриноген и затем подвергнуты воздействию потока со скоростями сдвига 500, 1000 и 4000 s^{-1} ($n = 3$). Приведена типичная зависимость количества активированных тромбоцитов, остающихся иммобилизованными на фибриногеновой подложке в условиях воздействия потока (**C**). Тромбоциты были проинкубированы с 0,2 % **DMCO** (контроль) или **MDL28170**. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение для 13 полей зрения. Приведена зависимость количества тромбоцитов прикрепляющихся к иммобилизованному фактору фон Виллебранда в условиях потока (100 s^{-1}) для неактивированных, активированных и активированных проинкубированных с **MDL28170** тромбоцитов (**D**). Количество прикрепившихся к подложке тромбоцитов было нормализовано на количество прикрепившихся неактивированных тромбоцитов. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение для 3-х независимых экспериментов.

Для анализа последовательности событий, протекающих при экспозиции ФС, была проанализирована кинетика разрушения прикрепления мембранных гликопротеинов к цитоскелету тромбоцитов (данные приведены в тексте диссертации на с.57). Полученный результат предполагает, что разрушение прикрепления мембранных гликопротеинов к цитоскелету происходит либо после экспозиции ФС (т.е. является более поздним процессом), либо является процессом параллельным и несвязанным напрямую с экспозицией ФС.

С помощью конфокальной микроскопии было исследовано разрушение прикрепления мембранных гликопротеинов к цитоскелету тромбоцитов по всей поверхности тромбоцита для выявления возможных мест локализации прикрепления мембранных гликопротеинов к цитоскелету (Рис. 6). Тромбоциты активировали после их иммобилизации на подложку, окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами к интегрину $\alpha_{IIb}\beta_3$ или гликопротеину Ib, фиксировали и обрабатывали детергентом; при этом на каждом этапе эксперимента тромбоциты визуализировали с помощью конфокальной микроскопии (Рис. 6). Полученные с помощью такого подхода результаты подтверждают результаты, полученные ранее с использованием проточной цитометрии, что разрушение прикрепления мембранных гликопротеинов к цитоскелету происходит только в ФС-положительных тромбоцитах, и свидетельствуют о том, что разрушение прикрепления происходит по всей поверхности тромбоцита за исключением специфической области мембраны тромбоцита, описанной ранее и условно названной «шапкой», которая характеризуется повышенным связыванием аннексина V [Abaeva et al., J. Biol. Chem., 2013;288:29621–29632].

Для проверки гипотезы о том, что разрушение прикрепления мембранных гликопротеинов к цитоскелету способно влиять на адгезивные свойства тромбоцитов, была исследована способность ФС-положительных тромбоцитов удерживаться на подложке в условиях потока (Рис.7 А-С). Даже при довольно низких физиологических скоростях сдвига (ниже 500 c^{-1}) мы наблюдали очень слабую способность ФС-положительных тромбоцитов

удерживаться на подложке с иммобилизованным фибриногеном. Однако в присутствии ингибиторов кальпаина способность ФС-положительных тромбоцитов удерживаться на подложке в условиях потока возростала более чем в 10 раз. Дополнительно было исследовано влияние ингибирования разрушения прикрепления мембранных гликопротеинов с помощью ингибиторов кальпаина на способность тромбоцитов адгезировать к поверхности (Рис.7 D). Полученные результаты свидетельствуют, что способность ФС-положительных тромбоцитов прикрепляться к поверхности с иммобилизованным фактором фон Виллебранда была крайне низка, в сравнении с неактивированными тромбоцитами, и ингибиторы кальпаина никак не влияли на нее.

Выводы:

1. Разработана методика, на основе анализа флуоресценции мембранных белков с помощью проточной цитометрии, позволяющая анализировать прикрепление мембранных белков к цитоскелету клеток в субпопуляциях активированных тромбоцитов.
2. В неактивированных и активированных ФС-отрицательных тромбоцитах мембранные адгезионные белки (интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$, гликопротеин Ib и P-селектин) прикреплены к цитоскелету, в то время как в экспонирующих ФС активированных тромбоцитах наблюдается разрушение прикрепления мембранных адгезионных белков к цитоскелету.
3. Разрушение прикрепления мембранных адгезионных белков к цитоскелету в ФС-положительных тромбоцитах коррелирует с протеолитической деградацией ряда цитоскелетных белков (таких как филамин и талин), которые участвуют в прикреплении мембранных белков к цитоскелету тромбоцитов.
4. Разрушение прикрепления мембранных адгезионных белков к цитоскелету, наблюдающееся в экспонирующих ФС активированных тромбоцитах, контролируется в основном кальций-зависимой протеазой кальпаином.

5. Кальпаин-контролируемое разрушение прикрепления адгезионных белков к цитоскелету приводит к неспособности экспонирующих ФС тромбоцитов удерживаться на подложке в условиях потока.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах:

1. **Artemenko E.O.**, Yakimenko A.O., Pichugin A.V., Ataulakhanov F.I., Pantelev M.A. Calpain-controlled detachment of major glycoproteins from cytoskeleton regulates adhesive properties of phosphatidylserine-positive activated platelets. // *Biochem. J.* – 2016. – V.473. – P.435-448.
2. Zakharova N.V., **Artemenko E.O.**, Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Demina I.A., Ataulakhanov F.I., Pantelev M.A. Platelet surface-associated activation and secretion-mediated inhibition of coagulation factor XII. // *PLoS One.* – 2015. – V. 10, № 2. – P.e0116665.
3. **Артеменко Е. О.**, Свешникова А. Н., Пантелеев М. А. Программируемая клеточная смерть тромбоцитов при их сверхактивации. // *Онкогематология.* – 2014. – № 3. – С.63-66.
4. Якименко А.О., Свешникова А.Н., **Артеменко Е.О.**, Пантелеев М.А. Этот загадочный тромбоцит. // *Природа.* – 2014. – Т. 1182, № 2. – С.3-8.
5. Tarandovskiy I.D., Artemenko E.O., Pantelev M.A., Sinauridze E.I., Ataulakhanov F.I. Antiplatelet agents can promote two-peaked thrombin generation in platelet rich plasma: mechanism and possible applications. // *PLoS One.* – 2013. – V. 8, № 2. – P.e55688.
6. Topalov N.N., Yakimenko A.O., Canault M., **Artemenko E.O.**, Zakharova N.V., Abaeva A.A., Loosveld M., Ataulakhanov F.I., Nurden A.T., Alessi M.-C., Pantelev M.A. Two types of procoagulant platelets are formed upon physiological activation and are controlled by integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* – 2012. – V. 32, № 10. – P.2475-2483.

Тезисы конференций:

7. Tarandovskiy I.D., Pantelev M.A., Sinauridze E.I., Topalov N.N., **Artemenko E.O.**, Podoplelova N.A., Ataullakhanov F.I. Appearance of the second thrombin peak on thrombin generation curve in platelet rich plasma depends on phosphatidylserine expression during platelet activation // 36th FEBS Congress, 2011. Torino, Italy. – Book of Abstracts. – 2011. – P.292.
8. Tarandovskiy I., Pantelev M., Sinauridze E., Topalov N., **Artemenko E.**, Podoplelova N., Ataullakhanov F. Formation of the second peak in platelet-rich plasma thrombin generation curve in linked with phosphatidylserine expression during platelet activation // XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), 2011. Kyoto, Japan. – Book of Abstracts. – 2011. – P.286.
9. **Artemenko E.O.**, Zakharova N.V., Ataullakhanov F.I., Pantelev M.A. Loss of membrane integrity and cytoskeleton destruction in the subpopulation of activated platelet undergoing programmed cell death // Programmed Cell Death in Biology and Medicine, 2012. Moscow, Russia. – Book of Abstracts – 2012. – P.10-11.
10. Obydenny S.I., Podoplelova N.A., Verkholomova F.Y., **Artemenko E.O.**, Zakharova N.V., Pantelev M.A. Functional and morphological characterization of the three activated platelet subpopulations // 1st EUPLAN Platelet Conference, 2012. Maastricht, Netherlands. – Book of Abstracts. – 2012. – P.69.
11. **Артеменко Е.О.**, Атауллаханов Ф.И., Пантелеев М.А. Кальпаин регулирует прикрепление интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ к цитоскелету, но не активацию интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ в тромбоцитах // Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии, 2013. Москва, Россия. – Сборник тезисов. – 2013. – С.29.
12. Tarandovskiy I., **Artemenko E.**, Kopylov K., Kumskova M., Pantelev M., Sinauridze E., Ataullakhanov F. The appearance of the second peak in platelet rich plasma thrombin generation curve can be provided by antiplatelet compounds: mechanism and possible applications // XXIV Congress of the International society on Thrombosis and Haemostasis, 2013. Amsterdam, Netherlands. – Book of Abstracts. – 2013. – P.316.

- 13. Zakharova N.V., Artemenko E.O., Podoplelova N.A., Ataullakhanov F.I., and Pantelev M.** Binding and activation of coagulation factor XII by activated platelet subpopulations and microparticles // XXIV Congress of the International society on Thrombosis and Haemostasis, 2013. Amsterdam, Netherlands. – Book of Abstracts. – 2013. – P.430.
- 14. Artemenko E.O., Ataullakhanov F.I., and Pantelev M.A.** The attachment of integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ and GpIb to the platelet cytoskeleton is disrupted in the phosphatidylserine-positive platelets as a result of calpain activation // XXIV Congress of the International society on Thrombosis and Haemostasis, 2013. Amsterdam, Netherlands. – Book of Abstracts. – 2013. – P.775-776.
- 15. Пантелеев М.А., Артеменко Е.О., Демина И.А., Захарова Н.В., Игнатова А.А., Карпова О.В., Котова Я.Н., Липец Е.Н., Обыденный С.И., Подоплелова Н.А., Свешникова А.Н., Якименко А.О.** Субпопуляции тромбоцитов крови и механизмы их взаимодействия с белками системы свертывания // II Конгресс гематологов России, 2014. Москва, Россия. – Сборник тезисов. – 2014. – С.23.
- 16. Artemenko E.O., Ataullakhanov F.I., Pantelev M.A.** Detachment of key adhesive proteins from the membrane skeleton is observed in phosphatidylserine-positive platelets // FEBS-EMBO, 2014. Paris, France. – Book of Abstracts. – 2014. – P.193.
- 17. Artemenko E.O., Yakimenko A.O., Ataullakhanov F.I., Pantelev M.A.** Detachment of key adhesive proteins from membrane skeleton is observed in phosphatidylserine-positive activated platelets and regulates their adhesive properties // International conference on bioorganic chemistry, biotechnology and bionanotechnology, 2014. Moscow, Russia. – Book of Abstracts. – 2014. – С.51.
- 18. Artemenko E., Yakimenko A., Pichugin A., Ataullakhanov F., Pantelev M.** Calpain-controlled detachment of major glycoproteins from cytoskeleton regulates adhesive properties of phosphatidylserine-positive activated platelets // XXV Congress of the International society on Thrombosis and Haemostasis, 2015. Toronto, Canada. – Book of Abstracts. – 2015. – P.188.