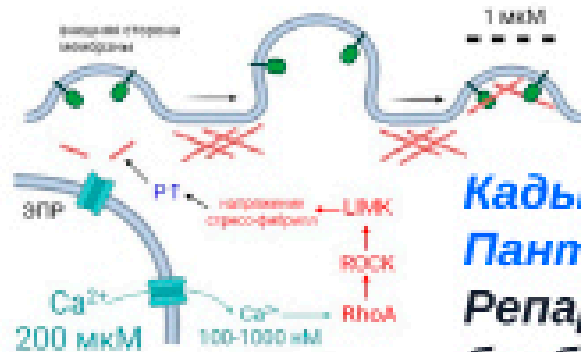
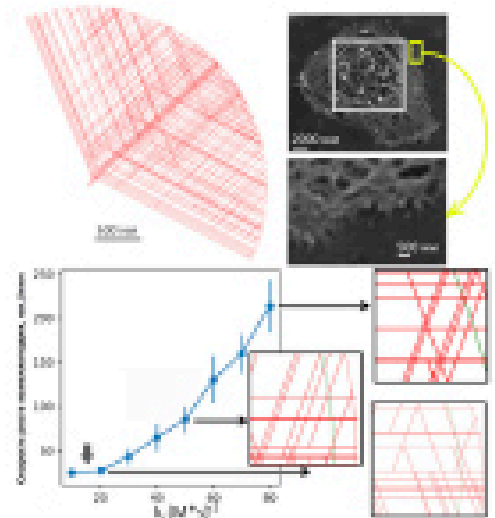


Власова И.М., Власов А.А.

Анализ уровня окислительного стресса по оценке повреждения белка плазмы сывороточного альбумина под действием окислительного агента.....3-8

Коробкина Ю.Д.Д., Свешникова А.Н.

Возможный подход к компьютерному моделированию формирования ламеллоподий тромбоцитов5-11



Кадыров Т.И., Свешникова А.Н., Пантелеев М.А.

Репарация плазматической мембраны, блябинг и микровезикуляция: параллели и взаимосвязи.....11-20

Коваленко Т.А.

Аннексин V: связывающийся с мембраной белок с широчайшим набором функций.....20-33



Пантелеев М.А.

Системная биология и физиология: между 2022 и 2023.....34

Содержание

1. *Власова И.М., Власов А.А.* Анализ уровня окислительного стресса по оценке повреждения белка плазмы сывороточного альбумина под действием окислительного агента.....3-8
2. *Коробкина Ю.Д.Д., Свешникова А.Н.* Возможный подход к компьютерному моделированию формирования ламеллоподий тромбоцитов5-11
3. *Кадыров Т.И., Свешникова А.Н., Пантелеев М.А.* Репарация плазматической мембраны, блеббинг и микровезикуляция: параллели и взаимосвязи.....11-20
4. *Коваленко Т.А.* Аннексин V: связывающийся с мембраной белок с широчайшим набором функций.....20-33
5. *Пантелеев М.А.* Системная биология и физиология: между 2022 и 2023.....34

Выпуск 2 журнала “Системная биология и физиология” (издаётся ЦТП ФХФ РАН с 2022 года)

Периодичность: 2 выпуска в год.

Главный редактор: доктор биологических наук, профессор Пантелеев Михаил Александрович

Анализ уровня окислительного стресса по оценке повреждения белка плазмы сывороточного альбумина под действием окислительного агента

Власова И.М.^{1,2#}, Власов А.А.¹

1. Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия
2. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия

Автор для переписки: vlasova@physics.msu.ru

Получено: 12.12.2022

Принято к публикации: 23.12.2022

Опубликовано: 28.12.2022

DOI: 10.52455/sbpr.01.202263011

Аннотация

Окислительный стресс, приводящий к окислительной модификации различных макромолекул, в том числе белков, сейчас рассматривается в качестве важного патогенетического звена многих заболеваний. В работе спектрофлуориметрическим методом изучено окислительное повреждение белка плазмы крови – бычьего сывороточного альбумина БСА – под действием окислительного агента – перекиси водорода H_2O_2 . Показано зависимое от концентрации H_2O_2 тушение собственной флуоресценции БСА. Методами математического моделирования рассчитаны константы тушения флуоресценции БСА в растворах перекиси водорода. Обнаруженные зависимости в константах тушения флуоресценции объяснены как окислительным повреждением микроокружения триптофановых остатков БСА, так и изменением нативной конформации белковых глобул при окислительном повреждении. Более значительное перекисное повреждение БСА происходит при более низких значениях pH в связи тем, что H_2O_2 как окислитель действует сильнее в кислой среде. Зарегистрированное тушение собственной флуоресценции белка при повреждении окислительным агентом может быть использовано как медицинский метод оценки уровня окислительного стресса в организме при диагностике ряда заболеваний.

Ключевые слова: окислительный стресс, активные формы кислорода, свободные радикалы, сывороточный альбумин, тушение флуоресценции, молекулярная динамика

Введение

Окислительный стресс – состояние избыточного образования в клетках и тканях активных форм кислорода (АФК), которые не могут быть нейтрализованы антиоксидантами, – сейчас рассматривается в качестве важного

патогенетического звена многих заболеваний вследствие универсальности окислительно-восстановительных реакций в организме человека [1-12].

Окислительный стресс может возникать как под действием неблагоприятных экзогенных факторов, так и в результате активации эндогенных механизмов генерации АФК и ослабления антиоксидантной защиты организма.

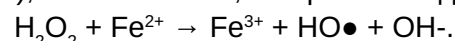
К основным активным формам кислорода (АФК) относятся супероксидный радикал ($O_2^{\bullet-}$), гидроксильный радикал (HO^{\bullet}), перекись водорода (H_2O_2), окись азота (NO^{\bullet}) и пероксинитрит ($ONOO^-$).

Супероксидный радикал ($O_2^{\bullet-}$) образуется, в основном, в митохондриях [12], при этом его основное назначение – образование других форм АФК.

Перекись водорода H_2O_2 может образовываться из супероксидного радикала под действием супероксиддисмутазы ($O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). Нейтральная молекула H_2O_2 наименее реакционноспособна среди АФК и в отсутствии ионов металлов стабильна, но высокая диффузионная способность позволяет ей легко преодолевать плазматическую мембрану и участвовать в большом количестве реакций образования АФК.

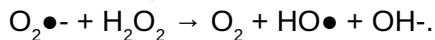
Гидроксильный радикал (HO^{\bullet}) является наиболее реакционным и «вредным» из АФК, с его образованием часто связывается цитотоксическое и мутагенное действие АФК при окислительном стрессе.

Основным источником гидроксильных радикалов (HO^{\bullet}) в биологических системах служит реакция Фентона с участием металлов переменной валентности (Fe^{2+} , Cu^+ , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{4+}), особенно Fe^{2+} , и перекиси водорода:



Также опасный гидроксильный радикал может возникнуть при наличии в среде опять же перекиси водорода H_2O_2 и супероксидного радикала $O_2^{\bullet-}$ в

реакции Хабера-Вейсса:



Дисбаланс равновесия между появлением АФК и их нейтрализацией антиоксидантными системами индуцирует в организме возникновение окислительного стресса, играющего важную роль в развитии многих заболеваний [1-12]. В частности, именно с позиций свободнорадикальной теории окислительного стресса объяснены в настоящее время многие ключевые моменты развития атеросклероза: разнообразие окислительных модификаций липопротеинов и белков плазмы крови приводит к повреждению стенок сосудов, аккумуляции холестерина и возникновению основного осложнения атеросклероза – тромбоза сосудов.

Бычий сывороточный альбумин (БСА, 64 кДа, рI БСА 4.9) – это белок из семейства альбуминов [13], выполняющий транспортные функции в плазме крови. Высокое содержание БСА в крови и в различных тканях, говорящее о ключевом значении этого белка для организма, объясняет интерес к изучению окислительного повреждения глобул БСА, что важно для понимания патогенеза различных заболеваний.

В данной работе представлены исследования методами флуоресцентного анализа окислительного повреждения глобул БСА перекисью водорода, являющейся возможным источником опасного гидроксильного радикала в ходе реакций Фентона и Хабера-Вейсса: выполнен анализ тушения собственной триптофановой флуоресценции БСА при добавлении перекиси водорода в растворы и методами математического моделирования определены константы тушения флуоресценции БСА под действием H_2O_2 .

Собственная флуоресценция белков широко изучается при оценках конформационного состояния белков [14-19]. Флуоресцентные методы высоко чувствительны к тонким конформационным перестройкам БСА, что позволяет использовать их для прямого анализа качественного состояния белка и косвенного анализа состояния организма при различных патологических процессах, в частности, в состоянии окислительного стресса.

Материалы и Методы

На основе буферных растворов с заданными значениями pH (0.1 М CH_3COOH – КОН, pH 3.0–5.0 и 0.1 М KH_2PO_4 – 0.1 М NaOH, pH 6.0–7.0, реактивы квалификации “х.ч.”) были приготовлены растворы 5 мкМ БСА (БСА производства фирмы Sigma-Aldrich), в которые были добавлены различные концентрации перекиси водорода H_2O_2 (5–200 мкМ) при pH 3.0–7.0.

Флуоресцентные исследования образцов

растворов «БСА – H_2O_2 » проводились на спектрофлуориметре Perkin Elmer LS55 при комнатной температуре. Измерения флуоресценции образцов БСА проводились через фиксированный интервал времени после добавления в них различных концентраций H_2O_2 .

Триптофановая флуоресценция БСА регистрировалась в диапазоне 300–500 нм при возбуждении светом с длиной волны $\lambda_{\text{возб}} = 295$ нм. Спектры флуоресценции БСА обрабатывались программой FL Winlab (Perkin Elmer).

Следует отметить, что найденные из экспериментов значения констант тушения флуоресценции БСА в растворах с добавлением H_2O_2 не должны рассматриваться в смысле их абсолютных значений, они важны для сравнения их значений и для оценки окислительного повреждения БСА при различных pH.

Результаты и обсуждение

Анализ экспериментальных спектров триптофановой флуоресценции БСА в растворах при добавлении окислительного агента

Исследованы спектры собственной триптофановой флуоресценции БСА при добавлении в белковые растворы перекиси водорода H_2O_2 (5–200 мкМ) при pH 3.0–7.0 (рис. 1 – пример спектров флуоресценции БСА при pH 5.0 при добавлении различных концентраций перекиси водорода в растворы).

Видно (рис. 1), что при добавлении перекиси водорода в белковые растворы происходит синее смещение максимума спектра флуоресценции белка: в растворах без H_2O_2 максимум флуоресценции на 347 нм, в растворах с H_2O_2 максимум спектра флуоресценции на 342 нм. Коротковолновый сдвиг, скорее

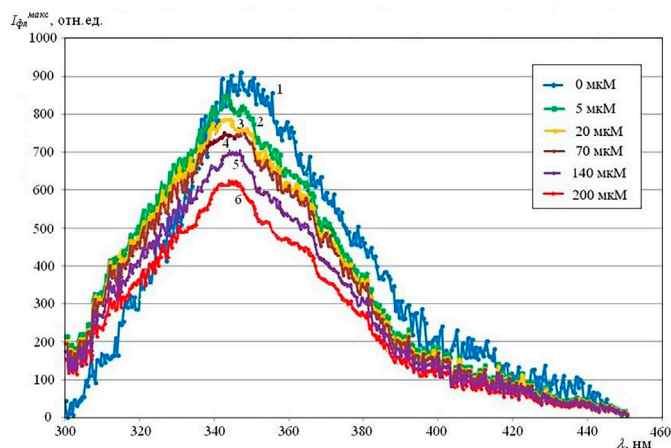


Рисунок 1. Спектры флуоресценции БСА ($\lambda_{\text{возб}} = 295$ нм) в растворах (pH 5.0) с различными концентрациями H_2O_2 . Концентрация H_2O_2 : 0 мкМ (1), 5 мкМ (2), 20 мкМ (3), 70 мкМ (4), 140 мкМ (5), 200 мкМ (6).

всего, говорит о погружении поверхностных триптофановых остатков БСА внутрь глобулы, т.е. о конформационном изменении глобул БСА под действием окислительного агента.

Построены зависимости интенсивности в максимуме спектра триптофановой флуоресценции БСА от концентрации H_2O_2 в растворах с различными значениями pH (рис. 2).

Обнаружено (рис. 2), что при всех значениях pH (3.0–7.0) происходит тушение триптофановой флуоресценции БСА при добавлении H_2O_2 . Добавление 5–20 мкМ H_2O_2 , т.е. концентрации равной концентрации БСА или немного большей её, приводит к незначительному тушению флуоресценции БСА и к незначительному изменению конформации белка. Добавление больших концентраций (20–200 мкМ) H_2O_2 в белковые растворы приводит к значительному тушению триптофановой флуоресценции БСА и, следовательно, к существенному окислительному повреждению структуры БСА.

Снижение интенсивности собственной флуоресценции БСА при добавлении перекиси водорода в раствор указывает на два одновременных процесса: 1) слабое воздействие низких концентраций H_2O_2 на триптофановые остатки БСА, а также изменение их микроокружения (повреждение остатков ароматических аминокислот белка отражается на флуоресцентных свойствах белка), 2) изменение нативного конформационного состояния глобул белка под действием высоких концентраций окислительного агента.

При сравнении величины тушения флуоресценции БСА при добавлении H_2O_2 в

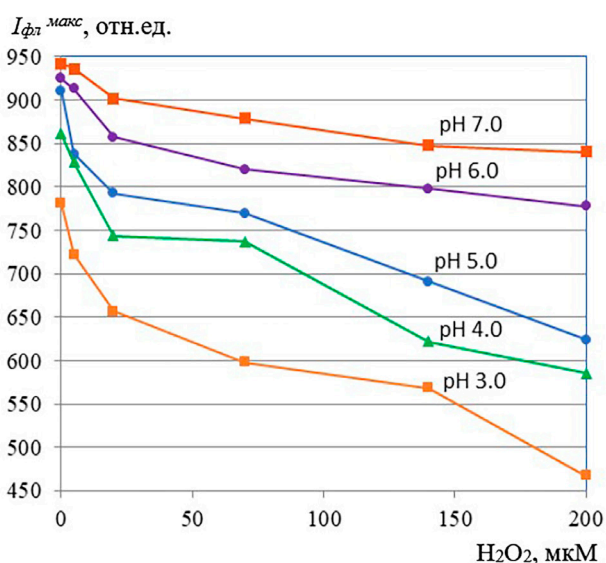


Рисунок 2. Интенсивность в максимуме спектра флуоресценции БСА в зависимости от концентрации H_2O_2 в растворах при различных значениях pH.

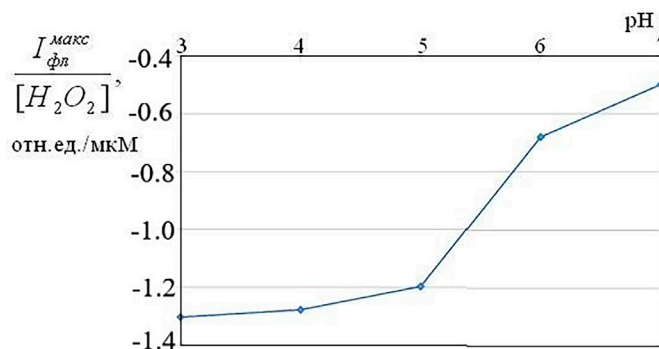


Рисунок 3. Среднее изменение интенсивности в максимуме спектра флуоресценции БСА при изменении концентрации H_2O_2 в растворах в зависимости от значения pH.

растворы при различных значениях pH видно (рис. 2), что более сильное тушение флуоресценции имеет место при более низких значениях pH.

Рассчитано среднее изменение интенсивности в максимуме спектра флуоресценции БСА при изменении концентрации H_2O_2 в зависимости от значений pH (рис. 3).

Значительное тушение флуоресценции БСА под действием H_2O_2 происходит при низких значениях pH (примерно 3.0–5.0), меньших изоэлектрической точки БСА (pI 4.9). Это объясняется тем, что H_2O_2 как окислитель действует сильнее в кислой среде. Следовательно, более сильное перекисное повреждение БСА и изменение его конформации происходит при более низких значениях pH. В водных растворах перекись водорода ведет себя как очень слабая кислота, проявляя слабые кислотные свойства.

Как упоминалось выше, перекись водорода является в ходе двух реакций поставщиком мощного высоко реакционноспособного окислителя – гидроксильного радикала ($HO\bullet$), который разрушающе действует на структуру белка.

Хотя перекись водорода в целом сама обладает малой реакционной способностью к окислению органических молекул в водной среде, но ее феномен в окислительном стресс заключается, во-первых, *in vivo* в ее легкой способности диффундировать через клеточные мембраны, и, во-вторых, как *in vivo*, так и *in vitro* в генерации из перекиси водорода агрессивных свободнорадикальных соединений.

Образовавшиеся в наших исследованиях в ходе реакций *in vitro* с перекисью водорода свободные радикалы (в частности, гидроксильный радикал $HO\bullet$), во-первых, влияют на триптофановые остатки БСА, меняя их микроокружение, и, во-вторых, повреждают нативную конформацию белка, вызывая динамическую перестройку глобул БСА.

При состоянии окислительного стресса под действием перекиси водорода и

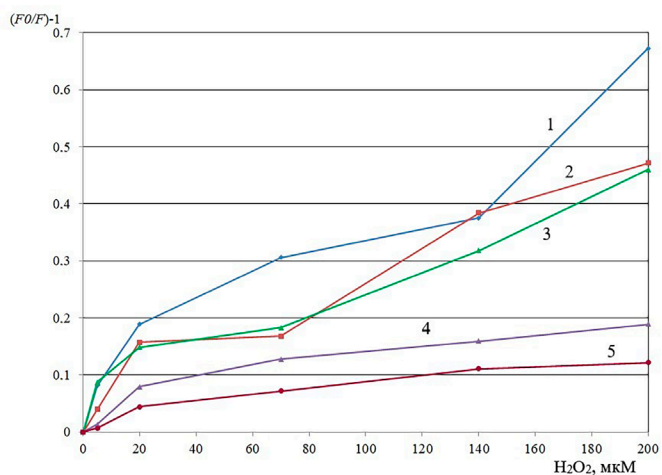


Рисунок 4. Зависимости $(F_0/F) - 1$ от $[Q_0]$, где F_0 – интенсивность флуоресценции БСА в отсутствие H_2O_2 , F – интенсивность флуоресценции БСА в присутствии H_2O_2 , $[Q_0]$ – концентрация H_2O_2 . Значения pH: 3.0 (1), 4.0 (2), 5.0 (3), 6.0 (4), 7.0 (5).

свободнорадикальных продуктов ее диссоциации разрушаются дисульфидные и другие типы связей, участвующих в формировании нативной конформации глобул белка, происходит изменение микроокружения триптофановых хромофорных групп БСА на фоне динамической перестройки глобул и, как следствие, происходит тушение триптофановой флуоресценции БСА.

Для анализа окислительных повреждений БСА перекисью водорода при различных значениях pH построены (рис. 4) зависимости $(F_0/F) - 1$ от $[Q_0]$, где F_0 – интенсивность флуоресценции БСА в отсутствие H_2O_2 , F – интенсивность флуоресценции БСА в присутствии H_2O_2 , $[Q_0]$ – концентрация H_2O_2 .

Математическая модель аппроксимации кривых тушения флуоресценции БСА по теории Штерна – Фольмера («эффективные» константы)

Проведен анализ тушения флуоресценции БСА добавлением перекиси водорода согласно модели Штерна – Фольмера с линейной аппроксимацией.

Следует отметить, что в данном нелинейном случае при аппроксимации графиков по модели Штерна – Фольмера можно говорить только об усредненных, эффективных константах тушения. Линейное приближение фактически есть линия тренда рассматриваемого процесса.

При тушении флуоресценции БСА в растворах добавлением перекиси водорода можно согласно теории Штерна – Фольмера [14, 15] записать:

$$F_0/F = 1 + K_{eff} * [Q_0]$$

где K_{eff} – эффективная константа тушения флуоресценции БСА, определяющая фактически окислительное повреждение белка перекисью

водорода (M-1). Данная модель Штерна-Фольмера описывает линейную зависимость $(F_0/F) - 1$ от $[Q_0]$.

Получена эффективная константа K_{eff} тушения флуоресценции БСА при добавлении H_2O_2 в растворы при различных значениях pH (рис. 5).

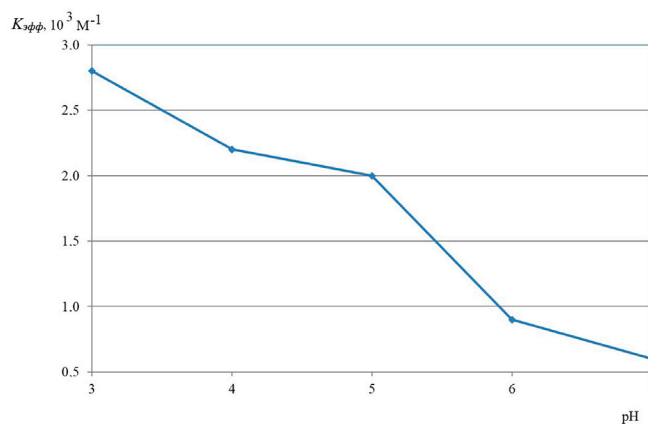


Рисунок 5. Константы K_{eff} тушения собственной флуоресценции БСА добавлением перекиси водорода H_2O_2 в растворы с различными значениями pH.

Видно (рис. 5), что наибольшие значения эффективная константа тушения флуоресценции БСА имеет при низких значениях pH, меньших изоэлектрической точки БСА, следовательно, при этих значениях pH происходят существенные окислительные повреждения БСА под действием свободнорадикальных продуктов, приводящие к крупным динамическим изменениям глобул белка. Тогда как при высоких значениях pH (>5.0), больших изоэлектрической точки БСА, константы тушения флуоресценции БСА имеют меньшие значения (в 2.2 – 4.5 раза), что указывает на меньшее окислительное повреждение БСА добавлением перекиси водорода при этих значениях pH.

Математическая модель разложения кривых тушения флуоресценции БСА на два линейных случая в рамках теории Штерна – Фольмера

Для более точного описания полученных нелинейных зависимостей $(F_0/F) - 1$ от $[Q_0]$ разложим их на две составляющие – для низких концентраций окислительного агента ($H_2O_2 < 20$ мкМ) и для высоких концентраций окислительного агента ($H_2O_2 > 20$ мкМ), линейно аппроксимируем каждую составляющую отдельно и получим две константы (рис. 6, константа K_1 для $H_2O_2 < 20$ мкМ и константа K_2 для $H_2O_2 > 20$ мкМ) тушения флуоресценции БСА в присутствии окислительного агента перекиси водорода.

Константа K_1 тушения флуоресценции БСА в присутствии H_2O_2 отражает воздействие низких концентраций H_2O_2 на сами триптофановые остатки БСА, а также на их микроокружение:

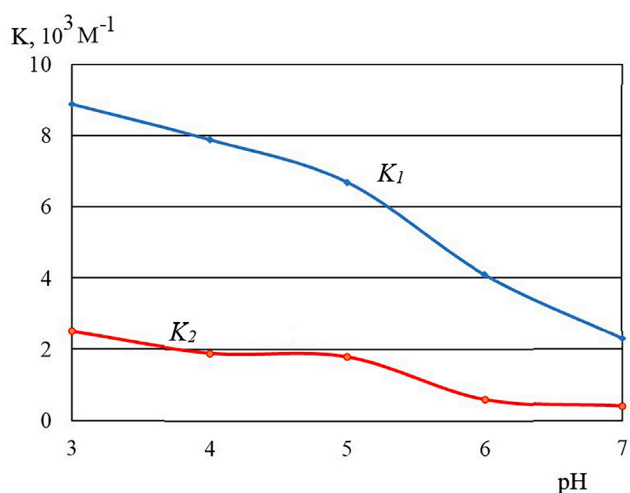


Рисунок 6. Константы K тушения собственной флуоресценции БСА при добавлении перекиси водорода H_2O_2 в растворы с различными значениями pH. K_1 – константа тушения флуоресценции БСА при концентрации H_2O_2 меньше 20 мкМ, K_2 – константа тушения флуоресценции БСА при концентрации H_2O_2 больше 20 мкМ.

окислительное повреждение ароматических колец триптофановых остатков БСА проявляется в их флуоресцентных свойствах. Образование радикальных соединений происходит при взаимодействии перекиси водорода H_2O_2 и её продукта гидроксильного радикала $\text{HO}\cdot$ с кольцами триптофановых аминокислотных остатков БСА.

Также, скорее всего, помимо триптофановых остатков, повреждаются тирозиновые остатки БСА, также дающие некоторый небольшой вклад в собственную флуоресценцию белка (при возбуждении 295 нм), а из тирозиновых остатков возможно образование фенокси-радикалов ($\text{Tyr}\cdot\text{O}\cdot$), димеризующихся с образованием бифенолов (битирозинов), вызывающих образование белковых сшивок и являющихся одним из маркеров окислительного повреждения белков.

Константа K_2 тушения флуоресценции БСА в присутствии H_2O_2 показывает «дальнодействующее» влияние высоких концентраций перекиси водорода уже не на ближнее окружение двух триптофановых остатков БСА, а на глобулу белка в целом: происходит изменение нативного конформационного состояния глобул БСА под действием высоких концентраций H_2O_2 .

Как следует из рис. 6, обе константы (K_1 и K_2) тушения флуоресценции БСА в присутствии H_2O_2 чувствительны к вариации значений pH растворов, что объясняется тем, что H_2O_2 как окислитель действует сильнее в кислой среде, и, как следствие, более сильное перекисное повреждение БСА происходит при более низких значениях pH.

Сравнивая две константы, можно заключить, что константа K_1 , определяемая окислительным

повреждением микроокружения триптофановых остатков, более чувствительна к изменению pH по сравнению с константой K_2 , определяемой свободнорадикальным повреждением глобул БСА в целом.

Также видно (рис. 6), что значения константы K_1 больше в 3.5 – 6.8 раз значений константы K_2 . Как известно, процесс окислительной модификации белков носит сложный характер в связи с образованием большого количества окисленных продуктов. Окислительное повреждение белков может быть связано как с нарушением самой полипептидной цепи, так и с повреждением отдельных аминокислотных остатков. И наиболее чувствительными к окислению являются ароматические аминокислотные остатки белков, такие как триптофановые, что и подтверждают высокие значения константы K_1 по сравнению с константой K_2 .

Заключение

Окислительный стресс приводит к окислительной модификации различных макромолекул, не только к перекисному окислению липидных молекул, но и к повреждению таких как макромолекул, как белки. Белки являются одними из основных мишеней для АФК, образующихся в процессе фотохимических воздействий, металл-зависимого окисления или как продукт окислительно-восстановительных реакций.

Изучение окислительной модификации белков появилось, как научное направление, сравнительно недавно по сравнению с классическими работами по перекисному окислительному повреждению липидов, но уже сейчас имеет широкое прикладное применение в медицинской практике [20-22].

Окислительное повреждение БСА в модели окислительного стресса, вызванного окислительным агентом перекисью водорода, было изучено в данной работе спектрофлуориметрическим методом: показано зависимое от концентрации перекиси водорода тушение собственной флуоресценции БСА, объясняемое как окислительным повреждением микроокружения триптофановых остатков БСА, так и изменением нативной конформации белковых глобул при окислительном повреждении.

Нативная конформация глобул БСА повреждается под действием окислительного агента в связи с образованием радикальных соединений в составе самого белка: углеродных радикалов, расположенных в глубине глобулы, пероксирадикалов, тиольных радикалов, азотистых радикалов и радикалов ароматических аминокислотных остатков.

Зарегистрированное тушение собственной

флуоресценции БСА при повреждении окислительным агентом может быть использовано как метод оценки уровня окислительного стресса в организме, что крайне важно как для фундаментальной, так и для прикладной медицины для контроля окислительного стресса и подбора соответствующей терапии заболевания, поскольку свободнорадикальные окислительные повреждения играют важную роль во многих болезнях.

Вклад авторов

Вклад И.М.В. в работу был определяющим (планирование исследования, выполнение эксперимента, анализ данных, написание и редактирование текста статьи); А.А.В. анализировал данные и редактировал текст статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что они не имеют конфликта интересов.

Список литературы

1. D. V. Zorov, M. Junaszova and S. J. Sollott, Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release, *Physiological Reviews*, vol. 94, no 3, pp. 909-950, 2014, DOI: 10.1152/physrev.00026.2013.
2. P. Wang, Q. Gong, J. Hu, X. Zhang and X. Li, Reactive oxygen species (ROS)-responsive prodrugs, probes, and theranostic prodrugs: applications in the ROS-related diseases, *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 64, no 1, pp. 298-325, 2021, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c01704.
3. Y. Wang, R. Branicky, A. Noe and S. Hekimi, Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling, *Journal of Cell Biology*, vol. 217, no 6, pp. 1915-1928, 2018, DOI: 10.1083/jcb.201708007.
4. R. St-Louis, C. Parmentier, V. Grange-Messent, S. Mhaouty-Kodja and H. Hardin-Pouzet, Reactive oxygen species are physiological mediators of the noradrenergic signalling pathway in the mouse supraoptic nucleus, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 71, pp. 231-239, 2014, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.024.
5. H. C. Ryu, C. Kim, J. Y. Kim, J. H. Kim and J. H. Chung, UVB radiation induces apoptosis in keratinocytes by activating a pathway linked to BLT2-reactive oxygen species, *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 130, no 4, pp. 1095-1106, 2010, DOI: 10.1038/jid.2009.436.
6. J. Kang, E.-H. Joe, E. J. Park, I. Jou and J. H. Kim, Reactive oxygen species mediate A β (25-35)-induced activation of BV-2 microglia, *NeuroReport*, vol. 12, no 7, pp. 1449-1452, 2001, DOI: 10.1097/00001756-200105250-00030.
7. E. Hervouet, H. Simonnet and C. Godinot, Mitochondria and reactive oxygen species in renal cancer, *Biochimie*, vol. 89, no 9, pp. 1080-1088, 2007, DOI: 10.1016/j.biochi.2007.03.010.
8. M. Chwa, S. R. Atilano, V. Reddy, N. Jordan, D.W. Kim and M. C. Kenney, Increased stress-induced generation of reactive oxygen species and apoptosis in human keratoconus fibroblasts, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 47, no 5, pp. 1902-1910, 2006, DOI: 10.1167/iovs.05-0828.
9. M. Kohlhaas, A. Knopp, T. Zeller, M. Bohm, C. Maack, M. F. Ong, T. Liu and B. O'Rourke, Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes, *Circulation*, vol. 121, no 14, pp. 1606-1613, 2010, DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.914911.
10. G. Manda, T. M. Neagu and M. T. Nechifor, Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies, *Current Chemical Biology*, vol. 3, no 1, pp. 22-46, 2009, DOI: 10.2174/187231309787158271.
11. P. R. Kvietyts and D. N. Granger, Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 52, no 3, pp. 556-592, 2012, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.002.
12. Н. К. Зенков, В. З. Ланкин, Е. Б. Меньщикова, Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: МАИК Наука / Интерпериодика, 2001.
13. Ю. А. Грызунов, Г. Е. Добрецов, Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. М.: ИРИУС, 1994.
14. И. Тиноко, К. Зауэр, Дж. Вэнг, Дж. Паглиси, Физическая химия. Принципы и применение в биологических науках. М.: Техносфера, 2005.
15. В. Шмидт, Оптическая спектроскопия для химиков и биологов. М.: Техносфера, 2007.
16. I. M. Vlasova, A.A. Vlasov and A. M. Saletsky, Interaction of ionic detergent cetyltrimethylammonium bromide with human serum albumin at various values of pH: spectroscopic study, *Journal Molecular Structure*, vol. 984, pp. 332-338, 2010, DOI: 10.1016/j.molstruc.2010.09.051.
17. I. M. Vlasova, V. V. Zhuravleva, A. A. Vlasov and A. M. Saletsky, Interaction of cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide with bovine serum albumin in dependence on pH: a study of tryptophan fluorescence, *Journal Molecular Structure*, vol. 1034, pp. 89-94, 2013, DOI: 10.1016/j.molstruc.2012.08.053.
18. I. M. Vlasova, V. V. Zhuravleva and A. M. Saletsky, Denaturation of bovine serum albumin initiated by sodium dodecyl sulfate as monitored via the intrinsic fluorescence of the protein, *Russian Journal of Physical Chemistry B*, vol. 8, no 3, pp. 385-390, 2014, DOI: 10.1134/S1990793114030154.
19. I. M. Vlasova, A. A. Vlasov, G. R. Grapendaal and A. M. Saletsky, Association constants in the bovine serum albumin / human serum albumin – Tween 20 system in aqueous solution, *Russian Journal of Physical Chemistry A*, vol. 92, no 4, pp. 712-716, 2018, DOI: 10.1134/S0036024418040325.
20. A. Hohn, J. Konig and T. Grune, Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins, *Journal of Proteomics*, vol. 92, pp. 132-159, 2013, DOI: 10.1016/j.jprot.2013.01.004.
21. T. Nakamura, C.K. Oh, X. Zhang and S.A. Lipton, Protein S-nitrosylation and oxidation contribute to protein misfolding in neurodegeneration, *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 172, pp. 562-577, 2021, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.07.002.
22. L. Yurina, A. Vasilyeva, M. Indeykina, A. Bugrova, M. Biryukova, M. Rosenfeld, A. Kononikhin and E. Nikolaev, Ozone-induced damage of fibrinogen molecules: identification of oxidation sites by high-resolution mass spectrometry, *Free Radical Research*, vol. 53, no 4, pp. 430-455, 2019, DOI: 10.1080/10715762.2019.1600686.

Возможный подход к компьютерному моделированию формирования ламеллоподий тромбоцитов

Коробкина Ю.Д.Д.^{1,2}, Свешникова А.Н.^{1-3#}

1. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия
2. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва, Россия
3. факультет фундаментальной физико-химической инженерии, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Автор для переписки: a.sveshnikova@physics.msu.ru

Получено: 01.12.2022

Принято к публикации: 15.12.2022

Опубликовано: 29.12.2022

DOI: [10.52455/sbpr.01.202263012](https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202263012)

Аннотация

Уважаемая редакция журнала Системная биология и физиология! В нашей предыдущей статье [1] была предложена компьютерная модель полимеризации актина при росте псевдоподии нейтрофила. В настоящем письме мы предлагаем вариант использования той же компьютерной модели для описания роста ламеллоподии тромбоцита. Тромбоциты – клеточные фрагменты, циркулирующие в кровотоке в течение 7-10 дней и отвечающие за перекрытие повреждений сосудистой стенки. Для выполнения данной функции тромбоцитам необходимо уметь быстро изменять форму, в частности, известен феномен «распластывания» тромбоцитов при контакте с поверхностью [2,3]. Данное изменение формы тромбоцита включает последовательность молекулярных перестроек [4,5], в частности, за времена порядка секунд формируются новые актиновые структуры – ламеллоподии и филоподии [5]. Филоподии – тонкие, богатые актином протрузии плазматической мембраны, а ламеллоподии – округлые протрузии, сходные с псевдоподиями нейтрофилов, но имеющие меньшие размеры [6]. Считается, что распастывание тромбоцита зависит от формирования именно ламеллоподий [4], причем они могут формироваться из существующих филоподий [7]. Как ламеллоподии, так и филоподии состоят из F-актина [8], формирующегося из G-актина только при активации тромбоцита. Считается, что актиновые филаменты (F-актин) «толкают» клеточную мембрану, что стимулирует образование мембранных протрузий. Этот процесс регулируется большим количеством белков, среди которых стоит выделить формины, белки WASP (Wiscott-Aldrich Syndrome Protein, белки синдрома Вискотта-Олдрича) и комплекс Agr2/3 [9]. Формины могут служить ядром для образования филамента [10], однако, их основная

функция состоит в поддержании растущего конца филамента [11]. Agr2/3 может как служить ядром образования новых филаментов, так и основывать точки ветвления под углом 70° на филаментах, что приводит к образованию разветвленной актиновой сети [9]. Активность Agr2/3 регулируется несколькими белками, среди которых особую роль играет связанный с плазматической мембраной WASP [1,6].

В настоящей работе мы используем ранее опубликованную компьютерную модель роста псевдоподии нейтрофила [1] для описания начальных стадий образования ламеллоподии тромбоцита. Существует ряд работ, в которых математическое моделирование применяется для описания роста актинового цитоскелета в ламеллоподиях [12,13], однако данная работа является первой, в которой моделируется рост ламеллоподии именно в тромбоците.

Модель представляет собой стохастический алгоритм полимеризации актина в двумерном пространстве с возможностью зависимо от Agr2/3 ветвления в окрестности мембраны клетки. Мы сравниваем рассчитанную скорость роста ламеллоподии с экспериментальными данными для здоровых доноров и пациентов с мутациями в гене ARPC1B, кодирующем одну из субъединиц комплекса Agr2/3. В результате сравнения мы делаем вывод, что модель может быть использована для описания начальных стадий формирования ламеллоподии, однако, для описания остановки роста требуется введение в модель других молекулярных механизмов.

Принципы построения модели

Настоящая компьютерная модель основана на опубликованной ранее модели для роста псевдоподии нейтрофила [1]. Вкратце, в модели учтены следующие события: полимеризация и деполимеризация актина и ветвление растущей

актиновой сети. В модели [1] полимеризация и ветвление актина в псевдоподии происходит только в узкой области, прилегающей к плазматической мембране [14], толщина которой измеряется в количестве длин актина (1 ед = 7 нм) и обозначается N . Если плотность филаментов, прилегающих к мембране, достигает критического значения, плазматическая мембрана клетки может «проталкиваться» растущими концами F-актина. Критическая плотность концов филаментов (N_{act}), необходимых для толкания мембраны, выбиралась по экспериментальным данным [15]. В данной работе также использовалось предположение, что ламеллоподия имеет форму полуокружности и не меняет её с течением времени.

Далее в получающихся уравнениях используются следующие обозначения: $[G]$ обозначает концентрацию G-актина в μM ; k_{on} — константа скорости полимеризации актина, $(\mu\text{M} \times \text{с})^{-1}$, k_{off} — константа скорости деполимеризации актина, с^{-1} , k — константа скорости ветвления актина $(\text{M} \times \text{с})^{-1}$, $[Arp]$ — концентрация комплексов Arp2/3, в μM .

Для вероятности присоединения мономера G-актина к растущему филаменту за промежуток времени dt (P_{on}) мы имеем следующее выражение:

$$P_{on} = 1 - \frac{1}{\exp(k_{on}[G]dt)} \quad (1)$$

Вероятность деполимеризации актина (P_{off}) описывается следующим образом:

$$P_{off} = 1 - \frac{1}{\exp(k_{off}dt)} \quad (2)$$

Для вероятности ветвления P_b мы применяем следующее приближение:

$$P_b = k[Arp]dt \quad (3)$$

Параметры модели приведены в Таблице 1. Интегрирование модели производилось с помощью Python 3.8. На каждом временном шаге для каждой ветви F-актина генерируется случайное число ri из $U(0,1)$. Если ri меньше вероятности роста ветви F-актина (P_{on}), к ветви добавляется один мономер G-актина. Таким же образом моделировались деполимеризация и ветвление каждой ветви. После ветвления дочерняя ветвь может с равной вероятностью иметь направление $+70^\circ$ или -70° по отношению к направлению родительской ветви.

В отличие от целого ряда клеток, в которых нуклеирующие филаменты актина могут иметь любое направление [16], в тромбоцитах рост ламеллоподии происходит от филоподии [7]. Поэтому, в отличие от нашей предыдущей модели ламеллоподии нейтрофила, мы предполагаем, что все изначальные филаменты сонаправлены с направлением роста ламеллоподии.

Результаты и обсуждение

Разработанная компьютерная модель описывала формирование разветвленной сети актина в характерными для ламеллоподий размерами (Рис. 1) при значениях параметров модели $k = 80 (\text{M} \times \text{с})^{-1}$ — константа ветвления филаментов, $N = 3$.

В экспериментальных данных по росту ламеллоподий тромбоцитов из работы [4] протрузия выростала за 8-10 минут на 1,5 - 2 μm , что соответствует предсказаниям модели, где размер ламеллоподии через 10 минут расчета составлял от 1,8 μm до 2,1 μm (Рис. 1А). При этом рассчитанная в модели максимальная скорость роста составила 0,6 $\mu\text{m}/\text{мин}$, что незначительно превышает экспериментально измеренную 0,5 $\mu\text{m}/\text{мин}$ [4]. Таким образом, предложенная

Таблица 1. Параметры компьютерной модели.

Параметр	Значение	Источник	Комментарий
$[G]_0$	300 μM	[4]	Начальная концентрация G-актина
k_{on}	7,4 $(\text{с} \times \mu\text{M})^{-1}$	[17]	Константа скорости полимеризации актина
k_{off}	0,89 с^{-1}	[17]	Константа скорости деполимеризации филамента
$[Arp]_0$	3 $\times 10^{-7}$ М	[5]	Начальная концентрация комплекса Arp2/3
N	5	[18]	Число филаментов в ядре полимеризации
N_{act}	241 на μm	[15]	Минимальная плотность «толкающих» филаментов

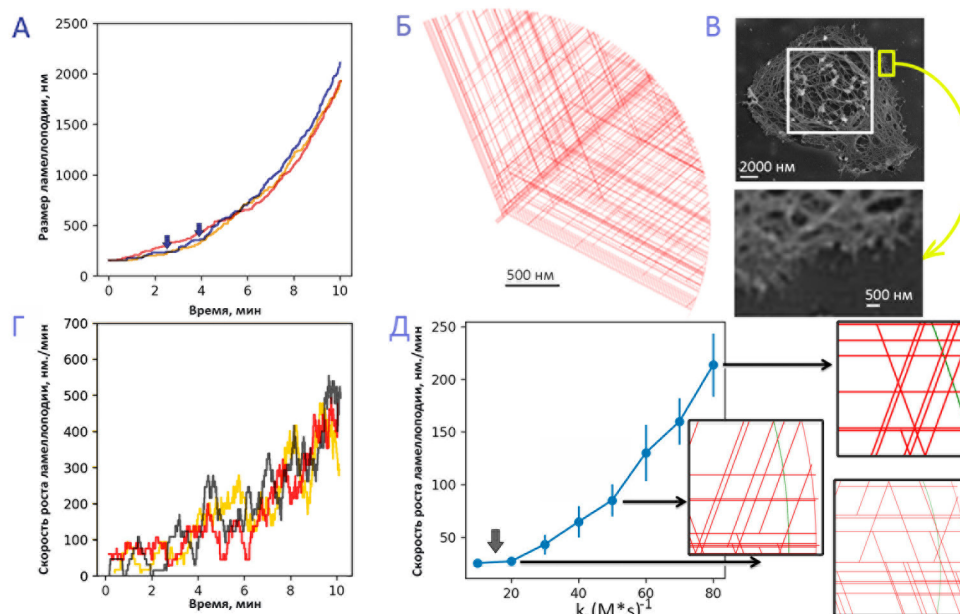


Рисунок 1. Результаты расчетов, сделанных в предлагаемой компьютерной модели роста ламеллоподии.

А. Типичная динамика роста ламеллоподии ($k = 80 (M \cdot s)^{-1}$, $N = 3$), синими стрелочками отмечены временные остановки роста. Б. Рассчитанное распределение актина в модели, построенной с параметрами как на панели А. В. Электронная микрофотография распределения актина в ламеллоподии тромбоцита, воспроизведено из работы [6]. Г. Скорость роста ламеллоподии для данных, представленных на панели А. Д. Расчетная зависимость скорости роста ламеллоподии от скорости ветвления (константа k). Средние данные для $n = 3$ запусков модели. Стрелочка показывает значение k , при котором рост ламеллоподии останавливается, при больших значениях k рост не останавливался. На вставках показана плотность актина, размер квадрата 100 нм x 100 нм.

модель успешно описывает характерные размеры и скорости роста ламеллоподии.

При расчетах было замечено, что рост ламеллоподии идет немонотонно, при этом возникают паузы порядка минуты (Рис. 1А, Г), что также соответствует экспериментальным данным [4]. Стоит отметить, что в модели наблюдалось замедление, а не полная остановка роста ламеллоподии, но приращение длины ламеллоподии в данных интервалах времени составляет < 50 мкм/мин, что значительно меньше дифракционного предела и не может быть наблюдаемо экспериментально.

В модели образования крупных псевдоподий нейтрофилов [1] не наблюдалось значительной зависимости скорости роста от вероятности ветвления. В настоящей модели, наоборот, скорость протрузии ламеллоподий тромбоцитов снижалась с 210 нм/мин до 52 нм/мин при снижении k с $80 (M \cdot s)^{-1}$ до $50 (M \cdot s)^{-1}$ (Рис. 1Д). Интересно, что при константах ветвления ниже $15 (M \cdot s)^{-1}$ рост ламеллоподий прекращался после достижения размера 200 - 300 нм. Это согласуется с экспериментальными данными о формировании ламеллоподий тромбоцитов у пациентов с дефицитом ARPC1B [19], у которых образование ламеллоподий в тромбоцитах прекращалось.

Настоящая компьютерная модель не может описать наблюдаемую в эксперименте остановку роста ламеллоподий через 8 - 10 минут

[4]. Напротив, скорость роста ламеллоподий со временем увеличивалась. По-видимому, ускорение роста актиновой сети связано со следующим: соотношение скоростей роста и ветвления таково, что плотность ветвей актина у мембраны постепенно увеличивается, приближаясь к N_{act} . При этом уменьшаются интервалы между событиями толкания мембраны. Когда плотность достигает значения большего или равного плотности N_{act} , необходимой для толкания мембраны, скорость роста ламеллоподии выходит на стационар, равный средней скорости роста актиновых филаментов (данные не показаны).

Предположительно, остановка роста связана с истощением G-актина или началом процесса ретракции в тромбоцитах [20]. Включение этих механизмов в модель будет предметом дальнейших исследований.

Вклад авторов

Ю.-Д.Д.К. разработала компьютерную модель, проводила расчеты, составила рисунок, написала текст рукописи; А.Н.С. руководила исследованием и редактировала рукопись.

Конфликт интересов

Все авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Финансирование

Исследование было поддержано грантом Российского научного фонда (РНФ) № 21-74-20087.

Список литературы

1. Korobkin J, Garcia A, Sveshnikova A. A minimal mathematical model of neutrophil pseudopodium formation during chemotaxis. *Systems Biology and Physiology Reports* 2021;1:10. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202103012>.
2. Inoue O, Suzuki-Inoue K, Dean WL, Frampton J, Watson SP. Integrin alpha2beta1 mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLCgamma2. *The Journal of Cell Biology* 2003;160:769–80. <https://doi.org/10.1083/jcb.200208043>.
3. Sveshnikova A, Stepanyan M, Panteleev M, Sveshnikova A, Stepanyan M, Panteleev M. Platelet functional responses and signalling: the molecular relationship. Part 1: responses. *Systems Biology and Physiology Reports* 2021;1:20. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202101014>.
4. Bearer EL, Prakash JM, Li Z. Actin dynamics in platelets. *International Review of Cytology* 2002;217:137–82. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(02\)17014-8](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(02)17014-8).
5. Li Z, Kim ES, Bearer EL. Arp2/3 complex is required for actin polymerization during platelet shape change. *Blood* 2002;99:4466–74. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.12.4466>.
6. Poulter NS, Pollitt AY, Davies A, Malinova D, Nash GB, Hannon MJ, et al. Platelet actin nodules are podosome-like structures dependent on Wiskott–Aldrich syndrome protein and ARP2/3 complex. *Nature Communications* 2015;6:7254. <https://doi.org/10.1038/ncomms8254>.
7. Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008;9:446–54. <https://doi.org/10.1038/nrm2406>.
8. Suetsugu S. Activation of nucleation promoting factors for directional actin filament elongation: Allosteric regulation and multimerization on the membrane. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2013;24:267–71. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.01.006>.
9. Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998;95:6181–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6181>.
10. Goode BL, Eck MJ. Mechanism and Function of Formins in the Control of Actin Assembly. *Annual Review of Biochemistry* 2007;76:593–627. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142647>.
11. Romero S, Le Clainche C, Didry D, Egile C, Pantaloni D, Carlier M-F. Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* 2004;119:419–29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.039>.
12. Oelz D, Schmeiser C. Derivation of a Model for Symmetric Lamellipodia with Instantaneous Cross-Link Turnover. *Archive for Rational Mechanics and Analysis* 2010;198:963–80. <https://doi.org/10.1007/s00205-010-0304-z>.
13. Chen X, Zhu H, Feng X, Li X, Lu Y, Wang Z, et al. Predictive assembling model reveals the self-adaptive elastic properties of lamellipodial actin networks for cell migration. *Communications Biology* 2020;3:616. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01335-z>.
14. Weiner OD, Servant G, Welch MD, Mitchison TJ, Sedat JW, Bourne HR. Spatial control of actin polymerization during neutrophil chemotaxis. *Nature Cell Biology* 1999;1:75–81. <https://doi.org/10.1038/10042>.
15. Abraham VC, Krishnamurthi V, Taylor DL, Lanni F. The Actin-Based Nanomachine at the Leading Edge of Migrating Cells. *Biophysical Journal* 1999;77:1721–32. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77018-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77018-9).
16. Vinzenz M, Nemethova M, Schur F, Mueller J, Narita A, Urban E, et al. Actin branching in the initiation and maintenance of lamellipodia. *Journal of Cell Science* 2012. <https://doi.org/10.1242/jcs.107623>.
17. Kuhn JR, Pollard TD. Real-Time Measurements of Actin Filament Polymerization by Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *Biophysical Journal* 2005;88:1387–402. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.047399>.
18. Joosten B, Willemse M, Fransen J, Cambi A, van den Dries K. Super-Resolution Correlative Light and Electron Microscopy (SR-CLEM) Reveals Novel Ultrastructural Insights Into Dendritic Cell Podosomes. *Frontiers in Immunology* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01908>.
19. Kahr WHA, Pluthero FG, Elkadri A, Warner N, Drobac M, Chen CH, et al. Loss of the Arp2/3 complex component ARPC1B causes platelet abnormalities and predisposes to inflammatory disease. *Nature Communications* 2017;8:14816. <https://doi.org/10.1038/ncomms14816>.
20. Haling JR, Monkley SJ, Critchley DR, Petrich BG. Talin-dependent integrin activation is required for fibrin clot retraction by platelets. *Blood* 2011;117:1719–1722. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-305433>.

Репарация плазматической мембраны, блеббинг и микровезикуляция: параллели и взаимосвязи

Кадыров Т.И.^{1,2}, Свешникова А.Н.^{1-3#}, Пантелеев М.А.¹⁻³

1. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия
2. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
3. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва, Россия

Автор для переписки: a.sveshnikova@physics.msu.ru

Получено: 08.12.2022

Принято к публикации: 15.12.2022

Опубликовано: 29.12.2022

DOI: 10.52455/sbpr.01.202263013

Аннотация

При активации или гибели клетки происходят деформации ее плазматической мембраны, которые грубо можно разделить на три категории. Первое явление, при котором происходит частичное локальное разрушение липидного бислоя и актинового кортекса и их последующее восстановление клеткой, относят к репарации мембраны. Вторая категория, при которой происходит образование выступающих наружу мембранных «пузырей», называется «блеббинг». И третья категория, при которой из плазматической мембраны образуются везикулы, содержащие белки мембраны и компоненты цитозоли, называется микровезикуляцией. Все эти явления играют важную роль в жизни организма: везикуляция является важным каналом обмена информацией между клетками, вместе с блеббингом она вносит существенный вклад в метастазирование опухолей, а нарушения репарации мембраны приводит к миодистрофиям. В литературе принято каждый из этих процессов изучать изолированно от других, хотя между ними есть множество параллелей и общих механизмов. Например, все три явления управляются перестройками актинового цитоскелета. В настоящем обзоре обсуждается вопрос, являются ли эти три процесса следствием одного и того же явления. Мы рассматриваем параллели, прослеживаемые в молекулярных механизмах этих явлений, которые приводят к гипотезе о возможности взаимобмена результатов исследований, посвященных процессам репарации мембраны, блеббинга и микровезикуляции.

Ключевые слова

Микровезикулы, блеббинг, репарация мембраны, цитоскелет, актин

Введение

Плазматическая мембрана – сложная

белково-липидная структура, стабилизируемая за счет гидрофобности липидов и поддерживаемая клеточным цитоскелетом [1]. Липидный и белковый составы мембраны меняются от клетки к клетке, однако, именно липидный состав и распределение липидов в мембране обеспечивает ее вязкость и текучесть [2]. Гибкость мембраны и возможность диффузии в ней компонент поддерживается подмембранным цитоскелетом – актиновым кортексом [3,4]. Задачей настоящего обзора является систематизация информации о трёх возможно патологических явлениях нарушения целостности мембраны, происходящих при участии кортексного цитоскелета. Спектр биологических функций этих явлений включает поддержание структуры, миграцию и коммуникацию [5]. Каждое из этих явлений по-отдельности описано в других обзорах [6–8], однако, в настоящем обзоре мы фокусируемся на параллелях в этих явлениях.

Далее мы кратко опишем эти процессы. Репарация или починка мембраны (plasma membrane repair) – это процесс восстановления целостности плазматической мембраны клетки после образования повреждения в результате механического или химического воздействия [9] (Рис. 1А). Явление репарации мембраны наблюдается в клетках всех эукариот и идет с характерными временами разняющимися от нескольких секунд до минут [10]. Существует несколько теоретических моделей процесса репарации мембраны [11,12]. В соответствие с одной из этих моделей [12], после повреждения по периферии образовавшейся бреши образуется сократительное актомиозиновое кольцо, сходное с сократительным кольцом, разделяющим мембраны дочерних клеток при цитокинезе. Предполагается, что за репарацию мембраны отвечает стягивание данного сократительного актомиозинового кольца. Репарация мембран имеет первостепенное значение для мышечной ткани, поскольку её клетки наиболее подвержены повреждениям [9]. Как будет рассмотрено далее, сигналом о необходимости запуска процесса

репарации является локальное повышение концентрации ионов кальция, вызванное его диффузией через повреждение [13].

Блеббинг (Рис 1Б, 2) – это процесс образования специфических мембранных протрузий, характеризующихся округлой формой и характерными размерами порядка нескольких микрометров [14,15]. Типичный жизненный цикл «пузыря» состоит из стадий быстрого роста, короткой статической фазы и постепенного сжатия до исходного состояния мембраны [16]. Блеббинг используется некоторыми клетками в особом механизме миграции (амебоидная миграция), при этом, по всей видимости, выбор направления осуществляется за счёт локализации блеббинга на лидирующей стороне и, если искусственно ослабить адгезию мембраны к кортексу по всей поверхности клетки, наблюдается более дезориентированное движение клетки [17].

Внеклеточные везикулы представляют собой любые внеклеточные структуры, окружённые липидным бислоем и имеющие размер менее 1 мкм [18]. Среди внеклеточных везикул выделяют экзосомы, микровезикулы и апоптотические тела [19]. Микровезикулы характеризуются образованием непосредственно из плазматической мембраны клетки (Рис. 1В) и размерами 150-1000 нм [18]. Экзосомы имеют

меньшие размеры и могут иметь значительно отличающийся от клетки-родителя состав [20]. Апоптотические тела представляют собой оставшиеся после клеточной смерти клеточные фрагменты и также, как и микровезикулы, имеют сходный состав с плазматической мембраной клетки [21]. В настоящем обзоре мы рассматриваем только процесс везикуляции.

Количество циркулирующих везикул, в том числе микровезикул, повышается во многих патологических состояниях, но они также участвуют и во многих физиологических процессах, таких как регенерация тканей и иммунный ответ [6]. Везикулы одного организма могут передавать своё содержимое (в том числе функционально активные РНК) в клетки другого, в том числе другого вида [22].

Далее мы будем рассматривать динамику этих процессов параллельно: в первом разделе мы опишем начальные стадии процессов, в том числе образования бреши в актиновом кортексе, во втором – процессы роста протрузии на мембране, в третьем – процессы стягивания бреши кортекса актомиозиновым цитоскелетом, и в четвертом мы обсудим процессы перехода и завершения преобразований мембраны.

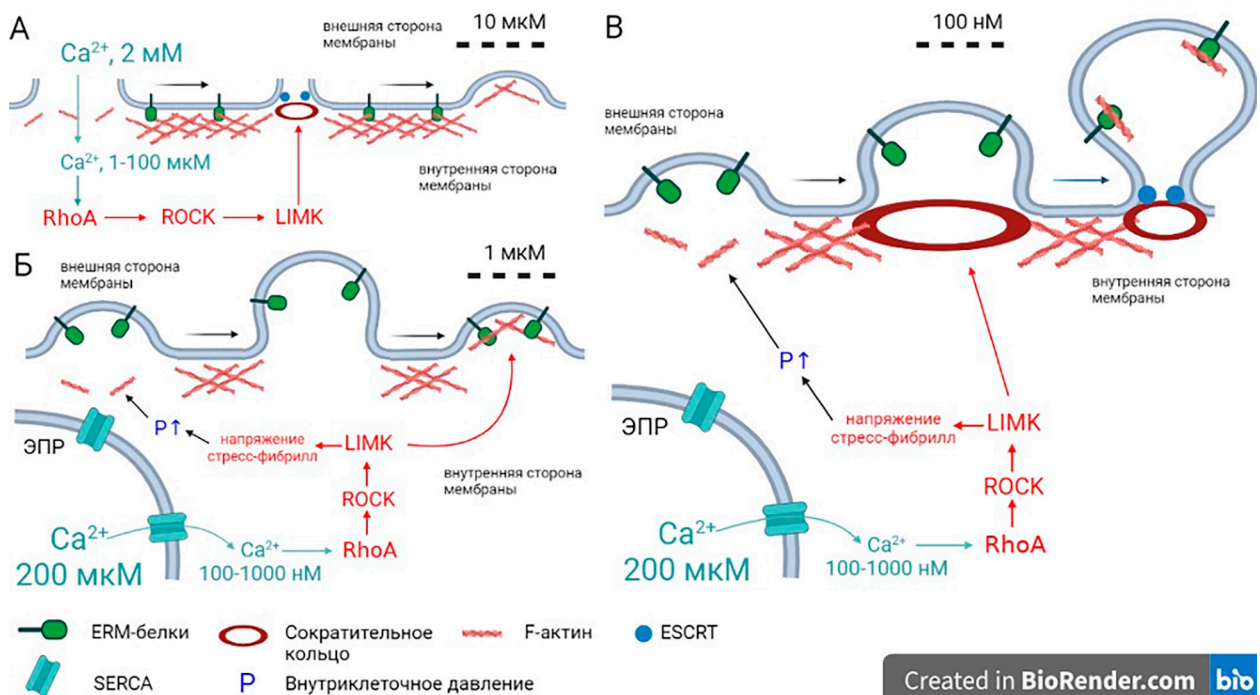


Рисунок 1. Схема процессов репарации мембраны (А), блеббинга (Б) и микровезикуляции (В). Повреждение клеточной мембраны или активация клетки вызывает подъём кальция посредством его входа через разрыв мембраны или выхода из эндоплазматического ретикулума через каналы SERCA. Кальций вызывает цепь сигнальных событий, приводящую к активации GTPазы RhoA, которая активирует киназу ROCK, активирующую киназу LIMK, которая в свою очередь активирует миозин-II и кофилин, запуская формирование сократительных волокон. Под действием кальциевой сигнализации к месту повреждения также привлекаются белки ESCRT (см. текст). При активации клетки из-за усиленного актомиозинового сокращения поднимается внутриклеточное давление, что может запустить блеббинг или везикуляцию, вызвав отрыв мембраны от актинового кортекса. В нормальном состоянии мембрана фиксирована на актиновом кортексе при помощи белков ERM (ezrin, radixin, moesin).

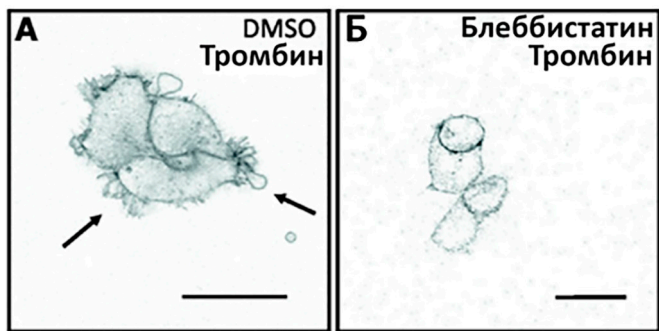


Рисунок 2. Конфокальные микрофотографии индуцированного тромбином блеббинга мембраны клеток HEK-293. Воспроизведено из работы [15], лицензия ССС 1300113-1. Клетки инкубированы с DMSO (А) или блеббистатином (ингибитор миозина II, среди прочих процессов ингибирует блеббинг, 10 мкМ) (Б) 15 мин, после этого производилась 2-минутная активация тромбином (протеаза, активирующая PAR-рецепторы и иницирующая кальциевую сигнализацию в клетках, 3 ед./мл). Стрелками указаны места блеббинга. Размеры отрезков - 20 мкм.

Начальная деформация мембраны

Иницирующим сигналом для репарации мембраны является появление брешы, в результате которой по электрохимическому градиенту в клетки заходят ионы кальция [13] (Рис. 1А). В ответ на подъем концентрации кальция к месту повреждения мембраны рекрутируются компоненты белкового комплекса ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport), которые также требуются во многих процессах везикуляции. Критический размер повреждения для возможности ESCRT-зависимой починки мембраны составляет 100 нм [14]. Зависимость механизмов репарации от кальция приводит к тому, что везикуляция клетки также стартует при ее активации, а при снижении концентрации внеклеточного кальция оба процесса ослабевают [23]. Под активацией клетки здесь и далее понимается изменение морфологии и/или поведения клетки в результате действия тех или иных активирующих факторов, как иммобилизованных на поверхности других клеток, так и растворимых лигандов клеточных рецепторов [24]. Необходимо отметить, однако, что источники кальция при репарации и при блеббинге мембраны различны: в первом случае кальций поступает непосредственно из внеклеточной среды, создавая локальную концентрацию до 100 мМ, а в случае блеббинга при клеточной активации и сопутствующем выходе кальция из эндоплазматического ретикулума цитоплазматические концентрации кальция составляют сотни нМ, что может отражаться в различии механизмов передачи кальциевого сигнала. Однако в обоих случаях подъем кальция ведёт к активации малых GTPаз, о котором будет сказано далее.

В работе [14] было сделано наблюдение, что в месте повреждения возникает «выпячивание» мембраны размером порядка нескольких микрометров. Авторы [14] высказали гипотезу, что это связано с локальным уменьшением натяжения мембраны, вызванного привлечением дополнительных мембран при сопутствующем экзоцитозе и деградацией актина [25]. Уменьшение целостности актинового кортекса и/или локальное увеличение внутриклеточного давления, вызванное различной осмолярностью с разных сторон мембраны [26], также способствует блеббину.

Дестабилизация цитоскелета может происходить в результате слабой активации клетки через G-белки, при этом в блеббинге задействованы G $\beta\gamma$ -сигнализация и β -аррестины [15], а также в результате активации интегринов. Например, тромбоциты производят микровезикулы в результате α IIb β 3-зависимой дестабилизации актинового цитоскелета [27]. Таким образом, уменьшение стабильности актина, составляющего кортекс, ведёт к увеличению как везикуляции, так и блеббинга.

Запуск образования «пузыря» при блеббинге происходит в результате появления брешы в актиновом кортексе и/или нарушения связи актина с мембраной, осуществляемой через ERM-белки (см. рис. 1) [28]. Показано, что блеббинг усиливается при повышении внутреннего давления в клетке и при ослаблении адгезии кортекса к мембране. Любопытно, что в достаточно больших клетках этот эффект может быть локальным, что говорит о неоднородности гидростатического давления [26].

И везикуляция, и блеббинг зависят от липидного состава мембраны [18]. Можно предположить, что эта зависимость связана как с ролью гидростатического давления, эффекты которого зависят от вязкости мембраны и от различных белками, изгибающих мембрану. Так, изменение активности фосфолипаз, происходящее при активации клетки, ведет к изменению состава мембраны [29], а связывающиеся с отрицательно заряженными фосфолипидами аннексины изменяют кривизну мембраны, способствуя блеббину и везикуляции [30]. Хотя авторам неизвестны работы, показывающие роль липидного состава мембраны в ее репарации, можно предположить, что скорость затягивания брешей в липидном бислое зависит от скоростей диффузии липидов в мембране, а, следовательно, и ее состава.

С другой стороны, в мембране также присутствуют липидные рафты, роль которых в процессах деформации мембраны неоднозначна. Известно, что снижение содержания холестерина в мембранах ингибирует везикуляцию [31], а

в работе [32] показано, что циркулирующие в крови моноцитарные и макрофаговые везикулы происходят из липидных рафтов. В микровезикулах также повышено содержание лизофосфатидилхолинов, сфингомиелинов и ацилкарнитинов [33]. Церамид также влияет на образование микровезикул [34]. Известно, что ингибирование сфингомиелиназ ведёт одновременно к уменьшению количества экзосом и к увеличению количества и размера микровезикул, а также к изменению их загрузки [35]. Таким образом, липидный состав мембраны однозначно влияет на процесс везикуляции и блеббинга, однако, механизмы этого влияния до конца не изучены.

С точки зрения белкового состава микровезикул, некоторые белки активно транспортируются к клеточной мембране и включаются в микровезикулы, в то время как другие мембранные белки исключаются из них [31]. Кроме того известно, что длинноцепочечная циркулирующая ДНК также включается в везикулы активным транспортом [36]. Эти данные свидетельствуют о том, что процесс микровезикуляции может быть не настолько стохастическим, как кажется на первый взгляд.

Увеличение размеров деформации мембраны

После образования бреши в актиновом кортексе рост «пузыря» при блеббинге происходит под действием гидростатического давления, что было предсказано в рамках компьютерных моделей и подтверждено экспериментально, и при этом на внутренней поверхности деформации отсутствует актин и актин-связывающие белки [37,38]. Отдельным вопросом является источник площади поверхности мембраны при ее деформациях. В работе Charras и соавторов [28] было показано, что при блеббинге суммарный объем клетки сохраняется. В более поздней работе того же коллектива было показано, что при росте пузыря размер его шейки уменьшается относительно его диаметра [38]. Авторы объяснили это потоком фосфолипидов мембраны на поверхность растущего пузыря через его шейку. Альтернативной гипотезой является развёртывание избытка клеточной мембраны, находящегося в её складках [39,40].

Рассмотрение пространственно-временного распределения появления и ретракции пузырей на поверхности клеток меланомы M2 с недостатком филамина показало, что в них отсутствуют корреляции на пространственных масштабах больших, чем 1-2 размера пузыря, и временных масштабах больших, чем 1-2 времени его роста и ретракции [38]. Такое близкое действие, по-видимому, связано с тем, что появление нового

пузыря ослабляет гидростатическое давление в соседних областях, сокращение пузыря обычно доходит до конца благодаря тому же падению гидростатического давления и исчерпанию запаса мембраны, а после конца жизненного цикла новый появляется просто в следствие высокой нестабильности мембраны. В целом это рассмотрение показывает, что блеббинг можно считать стохастическим процессом без дальних корреляций.

Ретракция деформации мембраны и репарация бреши

Классическим механизмом запуска починки мембраны является вход внеклеточного кальция [13]. В экспериментах на плодовых мушках было показано, что внутриклеточные аннексины реагируют на вход ионов кальция в клетку и кальций-зависимым образом локализуются на периферии бреши, после чего к ним происходит привлечение белка-эффектора малой GTPазы Rho, RhoGEF, который в свою очередь активирует Rho, который вместе с другими малыми GTP-азами Cdc42 и Rac образует кольцевые структуры вокруг бреши и регулирует актомиозиновое стягивание получившегося сократительного кольца [41] (Рис. 3).

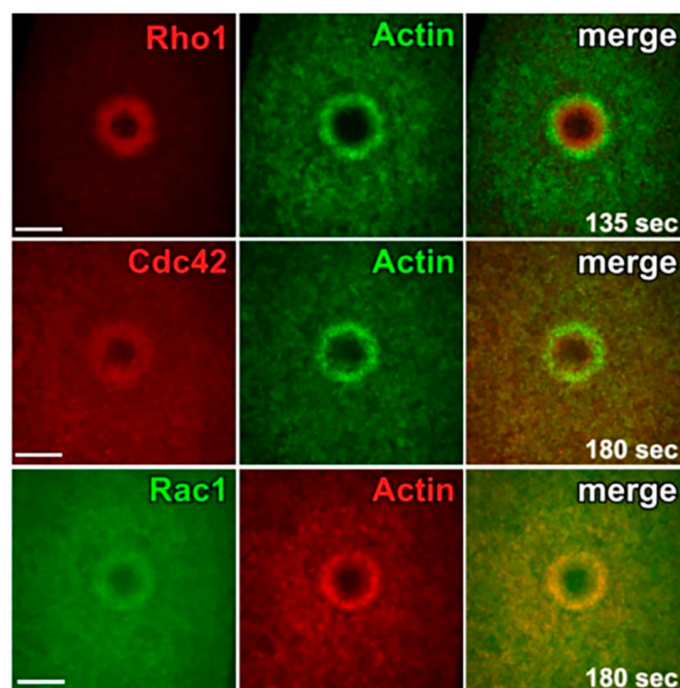


Рисунок 3. Участие малых GTP-аз в репарации мембраны. Воспроизведено из [42]. XY-проекция конфокального изображения лазерного повреждения мембраны клеток плодовой мушки, экспрессирующих флуоресцентно меченные белки. В верхней линии показаны распределение Rho1 (красный) и актина (зеленый), на средней линии показаны распределение Cdc42 (красный) и актина (зеленый); на нижней линии показаны распределение актина (красный) и Rac1 (зеленый). Размер отрезка 20 μm . «merge» – объединение монохромных изображений.

Фаза ретракции в блеббинге обусловлена привлечением белков адгезии мембраны и кортекса (ERM), актина, миозина-II и актин-связывающих белков (альфа-актинин, коронин, тропомиозин, фимбрин) к внутренней поверхности пузыря и активации актомиозинового сокращения новообразованного кортекса под действием Rho-ROCK сигнализации [26,43]. Для микровезикуляции также была показана необходимость активности сигнального пути Rho-ROCK-LIMK и Cdc42, причём были приведены свидетельства в пользу того, что Cdc42 отвечает за отрыв везикул от поверхности клеток [44,45]. Для ряда процессов образования микровезикул в разных клетках и организмах также показано участие транспортных систем клетки, в первую очередь комплекса белков ESCRT, среди которых выделяют четыре подтипа: ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II и ESCRT-III. Однако, насколько эти специфично участие этих белков для образования микровезикул и экзосом, остается предметом обсуждений [18,46,47].

Наблюдаемые переходы между репарацией мембраны, везикуляцией и блеббингом

Как следует из описанных выше процессов, блеббинг можно рассматривать как незаконченную везикуляцию. Действительно, есть свидетельства, что активация Cdc42 уменьшает количество неоторвавшихся микровезикул на поверхности

клеток и увеличивает их количество в среде [45]. Также, при движении через мягкие среды, раковые клетки переключаются из мезенхимального режима передвижения в амёбоидный, при котором происходит блеббинг, и при этом на них начинается везикуляция. Это переключение требует снижения активности Rac1 и увеличения активности RhoA [48]. Кроме того, искусственная задержка другой вовлеченной во внутриклеточный транспорт малой GTPазы, ARF6 (ADP-ribosylation factor 6), в неактивном состоянии вызывает снижение количества везикул в среде с клетками и возникновению у них множества выпячиваний на поверхности, напоминающих пузыри при блеббинге [49]. Подкласс везикул, образующихся из раковых клеток (онкосомы), действительно образуется из мембранных пузырей [50]. Однако такие везикулы имеют размеры порядка 1-10 мкм (что соответствует размерам пузырей). Видимо, для образования микровезикул требуются ESCRT и/или участие перераспределения липидов или мембранных рафтов.

Если рассматривать блеббинг как необходимую часть амёбоидного движения клеток, то тот факт, что микровезикуляция и миграция вызывается одним и тем же стимулом, также свидетельствует о сходстве данных процессов [51].

Свидетельств того, что репарация мембран относится к тому же классу процессов, не так много. Однако, в работах по исследованию репарации мембран в качестве побочного

	характерный размер	характерное время	патологические роли	физиологические роли	контекст
Репарация мембран	до ~10 мкм (рис. 3)	~10 мин ¹	-	поддержание целостности цитолеммы	эукариоты, в особенности мышечная ткань
Блеббинг	~1 мкм	~1 мин	инвазия раковых клеток	- амёбоидная миграция - обеспечение симметричности цитокинеза	эукариоты, в особенности раковые клетки, миграция в трёхмерном матриксе при слабой возможности адгезии и ограниченности пространства
Микро-везикуляция	~0,1 мкм	?	- аутоиммунные заболевания - нарушения системы гемостаза - метастазирование рака трансформацией здоровых клеток - активация нейтрофилов при кессонной болезни	- регенерация тканей - снабжение длинных аксонов мРНК - свёртывание на PS ⁺ мембранах	множество разнообразных типов клеток, включая прокариот, и все человеческие клетки, исследованные на этот предмет

Таблица 1. Сводная таблица характеристик процессов репарации мембраны, блеббинга и микровезикуляции. 1 - Некоторые реакции происходят в течение секунд. Указано полное время закрытия бреши, соответствующее указанному размеру (Andrews 2014)

продукта наблюдались внеклеточные везикулы, причём этот процесс был ESCRT-зависим при размерах повреждения менее 100 нм [52,53], что свидетельствует об общности механизмов этих процессов и возможности их совместного протекания.

Заключение

Среди множества физиологических процессов, сопровождающихся деформацией клеточной мембраны, её репарация, блеббинг и везикуляция оказываются особенно тесно взаимосвязаны. Они обладают одинаковыми физическими механизмами, одинаковыми регуляторными системами и имеют одинаковый статистический характер, сопутствуют друг-другу и перетекают друг в друга (Таблица 1).

Мы предполагаем, что все три процесса запускаются либо локальным разрушением клеточной мембраны, либо разрушением связи мембраны и актинового кортекса, либо локальным повреждением самого актинового кортекса. Любое из перечисленных возмущений инициирует перестройку примембранного цитоскелета, направленную на восстановление его целостности. С другой стороны, при активации клетки, в результате увеличения напряжения во всех актомиозиновых фибриллах клетки, увеличивается внутриклеточное давление, что само может вызвать локальное отделение мембраны от актинового кортекса. Таким образом, перестройка цитоскелета в этих процессах играет двойную роль: с одной стороны, она косвенно может приводить к запуску блеббинга и везикуляции, а с другой, сами эти процессы вызывают локальную перестройку, направленную на восстановление целостности клеточной оболочки.

Далее, все три процесса являются кальций-зависимыми (хотя характерные концентрации кальция для них различаются и механизмы передачи кальциевого сигнала могут быть различны) и все три управляются сигнализацией малых GTPаз семейства Rho.

Наконец, все три процесса представляют собой ответ на некоторое возмущение нормального состояния клетки или играют роль в патологических состояниях. Так, репарация мембраны является вынужденным ответом на повреждение мембраны. Мы предполагаем, что блеббинг по сути является побочным эффектом повреждения кортекса или его связи с мембраной, соответственно, восстановление кортекса при блеббинге также может быть отнесено к репарационным процессам. Внеклеточные везикулы, в свою очередь, принимают участие в развитии множества патологических состояний, таких как аутоиммунные заболевания и рак.

Таким образом можно сформулировать гипотезу, что три этих процесса являются родственными и представляют собой разные стороны единого клеточного ответа на повреждение структур клеточной оболочки, включающих липидный бислой вместе с актиновым кортексом. Благодаря этому, информация, полученная для одного из трёх рассмотренных здесь явлений, может зачастую оказаться полезной при исследовании другого, и дальнейшие исследования, посвящённые эволюции этих явлений и их функций, а также их взаимосвязей, позволят усовершенствовать фундаментальные представления о цитомеханике и процессах обмена информацией между клетками.

Вклад авторов

Т.И.К. провел анализ литературы, написал текст рукописи, составил рисунки и таблицу; А.Н.С. анализировала данные, редактировала рукопись и подбирала рисунки; М.А.П. руководил исследованием и редактировал рукопись.

Конфликт интересов

Все авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Финансирование

Исследование было поддержано грантом Российского научного фонда (РНФ) № 21-74-20087.

Список литературы

1. Mukerjee S, Saeedan AS, Ansari MN, Singh M. Polyunsaturated Fatty Acids Mediated Regulation of Membrane Biochemistry and Tumor Cell Membrane Integrity. *Membranes* 2021;11:479. <https://doi.org/10.3390/membranes11070479>.
2. Пыркова Д, Тарасова Н, Крылов Н, Нольде Д, Ефремов Р. ЛАТЕРАЛЬНАЯ КЛАСТЕРИЗАЦИЯ ЛИПИДОВ В ГИДРАТИРОВАННЫХ БИСЛОЯХ ИЗ ДИОЛЕОИЛФОСФАТИДИЛХОЛИНА И ДИПАЛЬМИТОИЛФОСФАТИДИЛХОЛИНА. *Биологические Мембраны* 2011;28:298–306.
3. Kusumi A, Nakada C, Ritchie K, Murase K, Suzuki K, Murakoshi H, et al. Paradigm Shift of the Plasma Membrane Concept from the Two-Dimensional Continuum Fluid to the Partitioned Fluid: High-Speed Single-Molecule Tracking of Membrane Molecules. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 2005;34:351–78. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.34.040204.144637>.
4. Воробьева НВ, Голубева Н, Пинегин Б. Роль актинового цитоскелета в регуляции дегрануляции нейтрофилов человека, активированных опсонизированным зимозаном. *Иммунология* 2014;35:124–9.
5. Dias C, Nylandsted J. Plasma membrane integrity in health and disease: significance and therapeutic potential. *Cell Discov* 2021;7:1–18. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00233-2>.
6. Clancy JW, Schmidtman M, D'Souza-Schorey C.

- The ins and outs of microvesicles. *FASEB Bioadv* 2021;3:399–406. <https://doi.org/10.1096/fba.2020-00127>.
7. Ikenouchi J, Aoki K. A Clockwork Bleb: cytoskeleton, calcium, and cytoplasmic fluidity. *The FEBS Journal* n.d.;n/a. <https://doi.org/10.1111/febs.16220>.
 8. Zhen Y, Radulovic M, Vietri M, Stenmark H. Sealing holes in cellular membranes. *The EMBO Journal* 2021;40:e106922. <https://doi.org/10.15252/embj.2020106922>.
 9. Demonbreun AR, McNally EM. Plasma Membrane Repair in Health and Disease. *Curr Top Membr* 2016;77:67–96. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2015.10.006>.
 10. Bucki R, Bachelot-Loza C, Zachowski A, Giraud F, Sulpice JC. Calcium induces phospholipid redistribution and microvesicle release in human erythrocyte membranes by independent pathways. *Biochemistry* 1998;37:15383–91. <https://doi.org/10.1021/bi9805238>.
 11. Nakamura M, Dominguez ANM, Decker JR, Hull AJ, Verboon JM, Parkhurst SM. Into the breach: how cells cope with wounds. *Open Biol* 2018;8:180135. <https://doi.org/10.1098/rsob.180135>.
 12. Schwayer C, Sikora M, Slovák J, Kardos R, Heisenberg C-P. Actin Rings of Power. *Developmental Cell* 2016;37:493–506. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.05.024>.
 13. Tang SK, Marshall WF. Self-repairing cells: How single cells heal membrane ruptures and restore lost structures. *Science* 2017;356:1022–5.
 14. Jimenez AJ, Maiuri P, Lafaurie-Janvore J, Divoux S, Piel M, Perez F. ESCRT Machinery Is Required for Plasma Membrane Repair. *Science* 2014;343:1247136. <https://doi.org/10.1126/science.1247136>.
 15. Vanderboor CMG, Thibeault PE, Nixon KCJ, Gros R, Kramer J, Ramachandran R. Proteinase-Activated Receptor 4 Activation Triggers Cell Membrane Blebbing through RhoA and β -Arrestin. *Mol Pharmacol* 2020;97:365–76. <https://doi.org/10.1124/mol.119.118232>.
 16. Fackler OT, Grosse R. Cell motility through plasma membrane blebbing. *J Cell Biol* 2008;181:879–84. <https://doi.org/10.1083/jcb.200802081>.
 17. Diz-Muñoz A, Krieg M, Bergert M, Ibarlucea-Benitez I, Muller DJ, Paluch E, et al. Control of Directed Cell Migration In Vivo by Membrane-to-Cortex Attachment. *PLoS Biol* 2010;8:e1000544. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000544>.
 18. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol* 2019;21:9–17. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>.
 19. Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 2010;107:1047–57. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.226456>.
 20. Ding X-Q, Wang Z-Y, Xia D, Wang R-X, Pan X-R, Tong J-H. Proteomic Profiling of Serum Exosomes From Patients With Metastatic Gastric Cancer. *Frontiers in Oncology* 2020;10.
 21. Battistelli M, Falcieri E. Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology (Basel)* 2020;9:21. <https://doi.org/10.3390/biology9010021>.
 22. Wehman AM, Poggioli C, Schweinsberg P, Grant BD, Nance J. The P4-ATPase TAT-5 inhibits the budding of extracellular vesicles in *C. elegans* embryos. *Curr Biol* 2011;21:1951–9. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.10.040>.
 23. Crawford S, Diamond D, Brustolon L, Penarreta R. Effect of increased extracellular ca on microvesicle production and tumor spheroid formation. *Cancer Microenviron* 2010;4:93–103. <https://doi.org/10.1007/s12307-010-0049-0>.
 24. QuickGO::Term GO:0001775 n.d. <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0001775> (accessed December 29, 2022).
 25. McNeil PL, Steinhardt RA. Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003;19:697–731. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.140101>.
 26. Charras GT, Hu C-K, Coughlin M, Mitchison TJ. Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *J Cell Biol* 2006;175:477–90. <https://doi.org/10.1083/jcb.200602085>.
 27. Cauwenberghs S, Feijge MAH, Harper AGS, Sage SO, Curvers J, Heemskerk JWM. Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Letters* 2006;580:5313–20. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.082>.
 28. Charras GT, Yarrow JC, Horton MA, Mahadevan L, Mitchison TJ. Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature* 2005;435:365–9. <https://doi.org/10.1038/nature03550>.
 29. Maeda A, Ozaki Y, Sivakumaran S, Akiyama T, Urakubo H, Usami A, et al. Ca²⁺-independent phospholipase A₂-dependent sustained Rho-kinase activation exhibits all-or-none response. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 2006;11:1071–83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.01001.x>.
 30. Bendix PM, Simonsen AC, Florentsen CD, Häger SC, Mularski A, Zanjani AAH, et al. Interdisciplinary Synergy to Reveal Mechanisms of Annexin-Mediated Plasma Membrane Shaping and Repair. *Cells* 2020;9:1029. <https://doi.org/10.3390/cells9041029>.
 31. D'Souza-Schorey C, Clancy JW. Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes Dev* 2012;26:1287–99. <https://doi.org/10.1101/gad.192351.112>.
 32. del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 2005;106:1604–11. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1095>.
 33. Haraszti RA, Didiot M-C, Sapp E, Leszyk J, Shaffer SA, Rockwell HE, et al. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *Journal of Extracellular Vesicles* 2016;5:32570. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.32570>.
 34. Budnik V, Ruiz-Cañada C, Wendler F. Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2016;17:160–72. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.29>.
 35. Menck K, Sönmezer C, Worst TS, Schulz M, Dihazi GH, Streit F, et al. Neutral sphingomyelinases control extracellular vesicles budding from the plasma membrane. *J Extracell Vesicles* 2017;6:1378056. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1378056>.
 36. Clancy JW, Sheehan CS, Boomgarden AC, D'Souza-Schorey C. Recruitment of DNA to tumor-derived microvesicles. *Cell Reports* 2022;38:110443. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110443>.
 37. Young J, Mitran S. A numerical model of cellular blebbing: a volume-conserving, fluid-structure interaction model of the entire cell. *J Biomech* 2010;43:210–20. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.09.025>.
 38. Charras GT, Coughlin M, Mitchison TJ, Mahadevan

- L. Life and Times of a Cellular Bleb. *Biophysical Journal* 2008;94:1836–53. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.113605>.
39. Boal D, Boal DH. *Mechanics of the Cell*. Cambridge University Press; 2012.
 40. Hamill OP, Martinac B. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiological Reviews* 2001;81:685–740.
 41. Nakamura M, Verboon JM, Parkhurst SM. Prepatterning by RhoGEFs governs Rho GTPase spatiotemporal dynamics during wound repair. *J Cell Biol* 2017;216:3959–69. <https://doi.org/10.1083/jcb.201704145>.
 42. Hui J, Stjepić V, Nakamura M, Parkhurst SM. Wrangling Actin Assemblies: Actin Ring Dynamics during Cell Wound Repair. *Cells* 2022;11:2777. <https://doi.org/10.3390/cells11182777>.
 43. Shiratsuchi A, Mori T, Nakanishi Y. Independence of plasma membrane blebbing from other biochemical and biological characteristics of apoptotic cells. *J Biochem* 2002;132:381–6. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003233>.
 44. Wang J, Zhuang X, Greene KS, Si H, Antonyak MA, Druso JE, et al. Cdc42 functions as a regulatory node for tumour-derived microvesicle biogenesis. *J Extracell Vesicles* 2021;10:e12051. <https://doi.org/10.1002/jev2.12051>.
 45. Antonyak MA, Wilson KF, Cerione RA. R(h)oads to microvesicles. *Small GTPases* 2012;3:219–24. <https://doi.org/10.4161/sgtp.20755>.
 46. Hurley JH. ESCRTs are everywhere. *EMBO J* 2015;34:2398–407. <https://doi.org/10.15252/embj.201592484>.
 47. Nabhan JF, Hu R, Oh RS, Cohen SN, Lu Q. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:4146–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200448109>.
 48. Sedgwick AE, Clancy JW, Olivia Balmert M, D'Souza-Schorey C. Extracellular microvesicles and invadopodia mediate non-overlapping modes of tumor cell invasion. *Sci Rep* 2015;5:14748. <https://doi.org/10.1038/srep14748>.
 49. Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol* 2009;19:1875–85. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.059>.
 50. Di Vizio D, Morello M, Dudley AC, Schow PW, Adam RM, Morley S, et al. Large Oncosomes in Human Prostate Cancer Tissues and in the Circulation of Mice with Metastatic Disease. *The American Journal of Pathology* 2012;181:1573–84. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.07.030>.
 51. Tognoli ML, Vlahov N, Steenbeek S, Grawenda AM, Eyres M, Cano-Rodriguez D, et al. RASSF1C oncogene elicits amoeboid invasion, cancer stemness, and extracellular vesicle release via a SRC/Rho axis. *EMBO J* 2021;40:e107680. <https://doi.org/10.15252/embj.2021107680>.
 52. Moe AM, Golding AE, Bement WM. Cell healing: Calcium, repair and regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 2015;45:18–23. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2015.09.026>.
 53. Blazek AD, Paleo BJ, Weisleder N. Plasma Membrane Repair: A Central Process for Maintaining Cellular Homeostasis. *Physiology* 2015;30:438–48. <https://doi.org/10.1152/physiol.00019.2015>.

Аннексин V: связывающийся с мембраной белок с широчайшим набором функций

Т.А. Коваленко^{1-2#}

1. Центр Теоретических Проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Средняя Калитниковская 30, Москва, 109029, Россия
2. Национальный Медицинский Исследовательский Центр Детской Гематологии Онкологии и Иммунологии им. Дмитрия Рогачёва, ул. Саморы Машела 1, Москва, 117198, Россия

Автор для переписки: after-ten@yandex.ru

Получено: 19.12.2022

Принято: 27.12.2022

Опубликовано: 30.12.2022

Аннотация

Аннексин V – это эукариотический белок семейства аннексинов, который способен обратимо связываться с фосфолипидными мембранами кальций-зависимым образом. Он обладает сложным механизмом связывания с мембраной, который включает формирование двумерной сетки из тримеров аннексина и значительное изменение структуры мембраны. Конкретные функции аннексина V значительно неизучены, хотя предполагается его участие в свертывании крови, процессе восстановления мембраны и активности канала для ионов кальция. Использование аннексина V как маркера фосфатидилсерин-положительных клеток в *in vitro* и *in vivo* исследованиях критически важно для понимания роли этого белка в клеточных процессах.

Данный обзор сфокусирован на структуре аннексина V и механизмах и кинетике его связывания с мембраной. Специфичность липида и процесс мультимеризации будет описан в полной мере. Наконец, будут обсуждены некоторые предполагаемые функции аннексина V, включая ингибирование свертывания крови и влияние на активность транспорта ионов кальция.

Ключевые слова: аннексин A5, мембранные взаимодействия, кальциевые каналы, ингибирование свертывания крови

Введение

Белки, которые способны обратимо связываться с клеточными мембранами или фосфолипидными микрочастицами (микровезикулами), играют важную роль в множестве процессов, среди которых внутриклеточная сигнализация, ремоделирование мембраны и желирование плазмы крови во время свертывания крови [1,2]. Среди мембрана-связывающих белков аннексины формируют крупное семейство, которое обладает одинаковыми структурными свойствами и демонстрируют кальций-зависимое связывание с

мембраной.

Аннексины – это эукариотические белки, и более 100 аннексинов были обнаружены у разных видов, включая позвоночных, беспозвоночных, одноклеточных эукариот и растений [3,4,5]. Обозначение 'A' определяет аннексины позвоночных; 'B' - аннексины беспозвоночных; 'C' - грибы и одноклеточные эукариоты; 'D' – растений; 'E' - протист. В человеке было идентифицировано 12 разных аннексинов: аннексины A1 – 11 и A13 [3].

Большинство аннексинов – цитозольные белки. Их транспортная РНК не имеет 5'-лидирующей последовательности, которая направляет синтезированные белки в эндоплазматический ретикулум, как это происходит в классическом пути секреции белков [6]. Внутри клетки аннексины играют роль во многих процессах, включая клеточную сигнализацию, экзоцитоз, репарацию мембраны и везикулярный транспорт. Тем не менее, аннексины A1, A2, A4 и A5 могут быть найдены на поверхности клетки или в циркуляции, и механизм их секреции почти неизвестен [7,8].

Аннексин A5 (или аннексин V) был впервые выделен в 1979 году [9] из человеческой плаценты и позже другой группой в 1985 году из артерий человека [10]. Это белок массой 35,7 кДа, который находится как в цитозоле клетки, так и в плазме крови здоровых людей в концентрации от 0,77 до 6,7 нг/мл по разным источникам [11-14]. Предполагается, что аннексин A5 принимает участие в таких важных физиологических процессах, как восстановление клеточной мембраны или ингибирование свертывания крови, хотя механизмы и значение его функционирования остаются непонятными.

У аннексина V есть сложный механизм связывания с мембраной. Он формирует тримеры на фосфолипидной мембране, затем эти тримеры формируют двумерную сетку, которая покрывает поверхность мембраны [15]. Согласно некоторым исследованиям механизм этого мультифазного связывания важен для функционирования аннексина V [16,17].

Благодаря своей способности связываться с

фосфолипидными мембранами, содержащими отрицательно заряженный фосфолипид, фосфатидилсерин (ФС), аннексин V используется в *in vitro* и *in vivo* исследованиях как маркер ФС-положительных клеток [7-12]. У пациентов он используется в процедуре клинической детекции апоптотических клеток, которая заключается во введении рекомбинантного человеческого аннексина V в циркуляцию [22,23].

Аннексин V участвует в важных физиологических процессах, а также используется как маркер ФС-положительных мембран, потому понимание его точных физиологических ролей и механизмов функционирования очень важно.

Настоящий обзор сфокусирован на структуре аннексина V и механизмах и кинетики связывания с мембраной. Будут описаны специфичность липидов и процесс мультимеризации. Также мы обсудим некоторые из предполагаемых функций аннексина V, включая ингибирование свертывания крови и влияние на активность транспорта ионов кальция.

1. Структура мономера аннексина V

Структура кристалла человеческого аннексина V была впервые получена в 1990 году Huber et al [24]. Структуры аннексина V крысы [25] и курицы [26] получены, а структуры аннексина V быка, мыши и шимпанзе предсказаны с помощью AlphaFold [27].

Белок состоит из 320 аминокислотных остатков и почти полностью является α -спиралью. Аминокислотная последовательность содержит короткий N-концевой хвост и четыре C-концевых повтора примерно по 70 остатков каждый. Эти четыре повтора скручены в четыре компактных домена, пронумерованных от I до IV, которые имеют похожую структуру. Каждый домен состоит их пяти α -спиралей, названных от A до E (например, спираль A в домене II называется спиралью IIA), которые соединены петлями, и выражение “петля IAB” относится к петле между спиральями A и B в домене I. Во всех доменах есть гидрофобные ядра [24,28,29]. Домены связаны следующим образом: N-концевой хвост, остатки

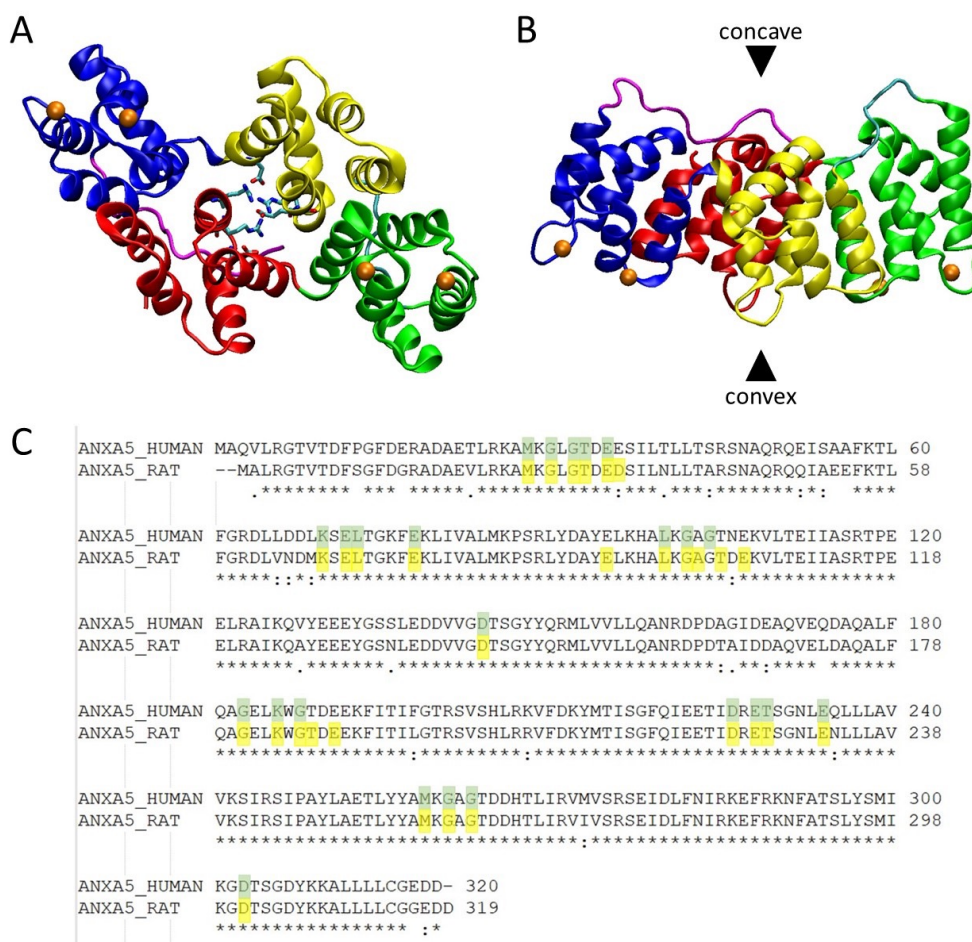


Рисунок 1. Структура Аннексина V. А. Вид с выпуклой стороны. Пурпурный, N-концевой хвост; синий, домен I; желтый, домен II; зеленый, домен III; красный, домен IV; оранжевый, ионы Ca^{2+} . В центре аннексина V представлены заряженные остатки Asp280, Arg276, Asp92, Arg117, Glu112, Arg271. В. Вид из домена II. Выпуклая и вогнутая стороны отмечены черными стрелками. Ca^{2+} -связывающие центры расположены на выпуклой поверхности, N-концевой хвост — на вогнутой стороне. Рисунки были созданы в VMD для текущего обзора с использованием структуры 1ANX [29] из банка данных PDB. С. Выравнивание последовательностей аннексина V человека (ANXA5_HUMAN) и крысы (ANXA5_RAT). Остатки, которые образуют сайты связывания Ca^{2+} , выделены зеленым и желтым цветом для человеческого и крысиного аннексина V соответственно. Выравнивание было выполнено с помощью UniProt Align.

Таблицы 1. Сайты связывания Ca^{2+} в аннексине V человека. Белковые домены и аминокислотные остатки, образующие сайты связывания Ca^{2+} , перечислены в столбцах 1 и 2. Одна строка соответствует одному домену или одному сайту связывания. Участки, выделенные в упомянутых исследованиях, выделены серым цветом.

		Huber et al., 1992 [28], 1AVR (PDB)	Sopkova et al., 1993 [29], 1ANX (PDB)	Burger et al., 1994 [33], 1HVD, 1HVE (PDB)	Hong et al., 2020 [31], 6K22 (PDB)
домен I (остатки 17 – 88)	M28, G30, G32, E72				
	T33, E35				
	K70, L73, E78				
домен II (остатки 89 – 159)	L100, G102, G104, D144				
домен III (остатки 168 – 246)	G183, K186, G188, E228				
	D226, T229, E234				
домен IV (остатки 247 – 317)	M259, G261, G263, D303				

5-16; домен I, остатки 17-88; домен II, 89-159; линкер, 160-167; домен III, 168-246; домен IV, 147-317 [24] (Рисунок 1А).

Четыре домена аннексина V упорядочены циклически. В центре этой структуры находится гидрофильная пора, которая покрыта заряженными остатками [24,28,29] и внутри формируются солевые мостики Asp280-Arg276, Asp92-Arg117 и Glu112-Arg271 (Рисунок 1А). Эти остатки неизменны в разных аннексинах [24].

Молекула аннексина V имеет немного искривленную форму с выпуклой и вогнутой сторонами (Рисунок 1Б). N-концевой хвост располагается на вогнутой стороне и нековалентно связывается с доменами I и IV [28], а сайты связывания с мембранной находятся на противоположной стороне, на выпуклой поверхности [29].

Аннексин V – это кальций-связывающий белок. Сайты связывания ионов кальция расположены на выпуклой стороне молекулы [29] (Рисунок 1Б), и остатки, формирующие этот сайт по разным источникам исследований аннексина V, собраны в Таблице 1. Кратко, было обнаружено семь различных сайтов связывания кальция: 3 в домене I, 1 в домене II, 2 в домене III и 1 в домене IV.

В аннексине V из *Rattus norvegicus* было идентифицировано до 11 сайтов связывания кальция (2H0K в PDB Data Bank) [16]. Интересно, что аннексин V человека и крысы совпадают, более чем на 90% (выравнивание последовательностей показано на Рисунке 1В), и аминокислотные остатки, которые находятся в сайтах связывания кальция, консервативны в обоих белках. Таким образом, можно спекулировать о том, что те же

11 сайтов связывания кальция есть в аннексине V человека.

Связывание ионов Ca^{2+} влияет на конформацию аннексина V. Сравнение Ca^{2+} -связанной и Ca^{2+} -несвязанной структур показало, что существенные изменения происходят в домене III. В несвязанной структуре Ca^{2+} карбонильный кислород Gly183 образует водородную связь с основной амидной группой Lys186. В Ca^{2+} -связанном аннексине V крысы эта связь между соответствующими остатками Gly181 и Lys184 разрывается, и оба остатка связывают Ca^{2+} через карбонильный кислород [30]. В результате в Ca^{2+} -связанной форме остаток Trp187 (Trp185 в крысином аннексине V) экспонируется на поверхности белка (обращенный наружу Trp187), тогда как в Ca^{2+} -несвязанной форме этот остаток скрыт в гидрофобном ядре белка (обращенный внутрь Trp187). Область белка, включающая остатки 220-246, становится более упорядоченной в Ca^{2+} -связанной форме аннексина V [29,31]. Молекулярно-динамическое моделирование показало, что аннексин V, связанный с Ca^{2+} , имеет чрезвычайно стабильную вторичную структуру практически без флуктуаций, в то время как несвязанная с Ca^{2+} форма демонстрирует большие колебания вторичной структуры и более низкое содержание α -спиральных структур (71%) по сравнению с Ca^{2+} -связанной формой (80%) [32]. Структура, не связанная с Ca^{2+} , более гибкая в растворе [32].

2. Связывание аннексина V с фосфолипидной мембраной

Аннексин V способен обратимо связываться с ФС-содержащими мембранами [34].

Эффективность связывания сильно зависит от концентрации Ca^{2+} и содержания ФС, и она была тщательно изучена в различных условиях.

Зависимость от Ca^{2+} и фосфолипидов

При низком pH (< 5) аннексин V связывается с ФС-содержащими мембранами даже в отсутствие Ca^{2+} . При нейтральном pH (= 7,4) Ca^{2+} абсолютно необходим для связывания аннексина V с мембраной, и было обнаружено, что пороговая концентрация, которая инициирует связывание, составляет около 16 мкМ [35]. В присутствии фосфолипидных везикул, липидных бислоев на стеклянных шариках или плоских липидных бислоев постоянного состава концентрация связанного белка возрастает с увеличением концентрации Ca^{2+} в растворе от 0,01 до 10 мМ [34,36,37]. Зависимость нелинейная: при наименьших концентрациях Ca^{2+} связывание равно нулю, оно следует за быстрым ростом количества адсорбированного белка вместе с концентрацией Ca^{2+} и достигает постоянного значения на самых высоких концентрациях Ca^{2+} . При большем содержании ФС для достижения максимального связывания требуется меньше Ca^{2+} [34,37].

Для малых однослойных везикул (SUV) (ФС/ФХ = 20/80) была определена равновесная константа диссоциации K_d : она снижается от 0,25 нМ до 0,05 нМ при увеличении концентрации Ca^{2+} от 0 до 0,8 мМ и почти постоянна при концентрации Ca^{2+} выше, чем 0,8 мМ [36].

Интересно, что концентрация связанного белка в присутствии насыщающей концентрации Ca^{2+} (когда связывание максимально) оказалась одинаковой на планарных фосфолипидных бислоях существенно разного состава (ФС варьируется от 1 до 100%) [34]. Напротив, для SUV количество молекул фосфолипидов на связанный аннексин V оказалось примерно в 3 раза выше при ФС/ФХ = 10/90 по сравнению с ФС/ФХ = 20/80 в присутствии насыщающей концентрации Ca^{2+} , а это означает, что меньшее количество аннексина V было связано с везикулами с более низким содержанием ФС, даже когда концентрация Ca^{2+} достаточно высока для достижения максимального связывания [36]. Это кажущееся несоответствие может быть связано с различием изученных фосфолипидных систем.

В присутствии постоянной концентрации Ca^{2+} определяли зависимость связывания аннексина V от содержания ФС [36-39]. Количество молекул фосфолипидов, приходящихся на связанный аннексин V, нелинейно уменьшалось от 1100 до 84 при увеличении содержания фосфолипидов в SUV от 10 до 50%, концентрация Ca^{2+} равнялась 1,2 мМ. Это означает, что большее количество белка связано с более высоким содержанием ФС. Для

всех исследованных составов SUV равновесная константа диссоциации K_d не изменилась и составила $0,036 \pm 0,011$ нМ. Таким образом, основные изменения в связывании аннексина V с везикулами различного содержания связаны с изменением стехиометрии и плотности сайтов связывания, а не сродства к сайту связывания [36]. В присутствии липидных бислоев на стеклянных шариках или плоских липидных бислоях количество связанного белка также увеличивается с содержанием ФС при добавлении различных концентраций Ca^{2+} [37,38]. Зависимость носит нелинейный характер с быстрым увеличением связывания при содержании ФС менее 4% и практически постоянным значением при содержании ФС более 4% [37] или еще более сложным поведением [38]. В более позднем исследовании было обнаружено, что связывание аннексина V демонстрирует пороговое поведение: в присутствии 1,5 мМ Ca^{2+} белок не связывается с мембранами, содержащими менее 8% ФС, и проявляет максимальное связывание при более высоком содержании ФС [40].

Связывание аннексина V не специфично только для ФС [34,37]. Исследования с различными типами фосфолипидов показали, что аннексин V человека способен связываться с плоскими бислоями, содержащими 30 % кардиолипина, или фосфатидилглицерина (ФГ), или фосфатидилинозита (ФИ) с 70 % фосфатидилхолина (ФХ) в присутствии Ca^{2+} , а концентрация связанного белка составляет то же, что и для ФС/ФХ = 30/70 [34]. Аннексин V крысы связывается с SUV, состоящими из ФХ/фосфатидной кислоты (ФК) = 50/50 [41]. Аннексин V человека способен связываться с большими однослойными везикулами (LUV), состоящими из ДОФГ/ДОФХ = 20/80, как это наблюдалось с помощью криоэлектронной микроскопии [42], и с бислоями, содержащими более 20% фосфатидилэтаноламина (ФЭ). Добавление ФЭ к везикулам, содержащим ФХ и ФС, снижает минимальное содержание ФС, необходимое для связывания аннексина V, и приводит к более раннему достижению максимального связывания [37,40].

Данные о влиянии холестерина противоречивы. Добавление холестерина к мембранам ФС/ФХ на стеклянных шариках ослабляет связывание [37]. Напротив, для LUV было показано, что холестерин способствует связыванию с мембранами ФХ/ФС [39,43]. Несоответствие может быть связано с различием используемых фосфолипидных систем или содержания ФС.

Холестерин стабилизирует связанный с мембраной аннексин V, и константа скорости диссоциации k_d снижается с $1,69 \times 10^{-3}$ с⁻¹ для ФС/ФХ = 20/80 до $3,24 \times 10^{-4}$ с⁻¹ для ФС/ФХ/

холестерин = 20/70/10 [39].

Аннексин V не связывается со 100% мембранами ФХ [44] или мембранами, состоящими из ФХ и холестерина [39]. Однако существующие исследования фосфолипидов разных типов весьма ограничены, и в них используется аннексин V разных видов. Таким образом, необходимы дополнительные обширные исследования, чтобы полностью выяснить влияние различных головных групп фосфолипидов и типов цепей жирных кислот на взаимодействие аннексина V с мембраной.

Связывание аннексина V специфично для ионов Ca^{2+} . В присутствии других двухвалентных катионов, включая Zn^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} , белок связывается с мембраной значительно меньше или почти не связывается [32,34]. При молекулярно-динамическом моделировании структуры аннексина V с 4 связанными ионами Mg^{2+} или 4 Ca^{2+} было показано, что ионы Mg^{2+} в значительной степени встроены в структуру белка и менее доступны для молекул растворителя, чем ионы Ca^{2+} [32]. На основании этих данных было высказано предположение, что Mg^{2+} менее доступен для фосфолипидфосфатной группы, которая участвует в Ca^{2+} -опосредованном мембранном связывании аннексина V, и, таким образом, связывание нарушается.

Добавление иона Zn^{2+} в небольшой концентрации (50 мкМ) к раствору, содержащему ионы Ca^{2+} , улучшает связывание аннексина V с ФС-содержащими мембранами, и для достижения максимального связывания требуется меньше Ca^{2+} [34]. Таким образом, было показано, что Ca^{2+} и Zn^{2+} обладают синергетическим эффектом, и точная причина этого в настоящее время неизвестна.

Связывание аннексина V зависит от кривизны мембраны: белок лучше связывается с плоскими фосфолипидными бислоями, чем с небольшими фосфолипидными везикулами с высокой кривизной, и для достижения максимального связывания с везикулами требуется больше Ca^{2+} , чем с плоскими бислоями [17]. Этот эффект может быть обусловлен способностью аннексина V образовывать мультимерные массивы на мембране, и формированию таких массивов могут противодействовать стерические ограничения на поверхности маленьких везикул, где соседние молекулы аннексина V могут образовывать угол друг с другом.

Структурные соображения, касающиеся связывания мембраны

Исследования связывания аннексина V с мембранами на субмолекулярном уровне выявили, что все четыре домена белка участвуют во взаимодействиях с фосфолипидами [45].

Наблюдаются три типа белково-мембранных взаимодействий.

Первый тип — это так называемые « Ca^{2+} -мостики», когда ион Ca^{2+} взаимодействует одновременно с сайтом связывания белка и заряженными группами фосфолипидов. В этом типе связывания могут участвовать как фосфатные, так и карбоксильные группы ФС [45]. Один ион Ca^{2+} может быть хелатирован более чем одной липидной молекулой [46]. Этот тип взаимодействий был также предложен для крысиного аннексина V в рентгеноструктурном исследовании [47].

Второй тип взаимодействий заключается в образовании водородных связей между карбоксильными группами ФС или фосфатного кислорода и аминокислотными остатками белка, к которым относятся Lys76, Lys101, Lys108, Thr74 и Ser305 [45].

Третий тип контактов формируется за счет гидрофобного эффекта. В этом типе участвует Trp187 [45].

Мультимеризация аннексина V

Предполагается, что аннексин V в растворе является мономерным, но способен образовывать двумерные решетки на поверхности мембраны. Такие решетки образуются, когда молекулы аннексина V связываются друг с другом и организуются в большие высокоструктурированные массивы связанных молекул. Основной структурной единицей этих массивов является тример аннексина V, визуализированный с помощью рентгеновской кристаллографии [29,31], атомно-силовой микроскопии [15,46] и электронной микроскопии [15,33,48,49] (схема представлена на Рисунке 2А).

На мембранах разного состава наблюдались два разных типа 2D-матриц аннексина V: так называемые решетки р6 и р3 (рис. 2В, С). Решетка р3 примерно в 1,2 раза плотнее р6. Решетка р6 была единственной, представленной на мембранах, содержащих менее 40% ФС, а р3 наблюдалась на мембранах, содержащих 40% ФС и более. Решетка Р3 может трансформироваться в р6 при истощении Ca^{2+} в системе или когда липидная поверхность, доступная для формирования массива, увеличивается за счет добавления фосфолипидов к мембране, покрытой аннексином V. Решетка Р6 может трансформироваться в р3 при добавлении избытка аннексина V [15].

Структура решеток аннексина V человека и контакты между отдельными тримерами аннексина V были тщательно изучены с использованием рентгеновской кристаллографии и комбинации атомно-силовой микроскопии и моделирования структуры [31,46].

В решетке р6 были выделены два типа

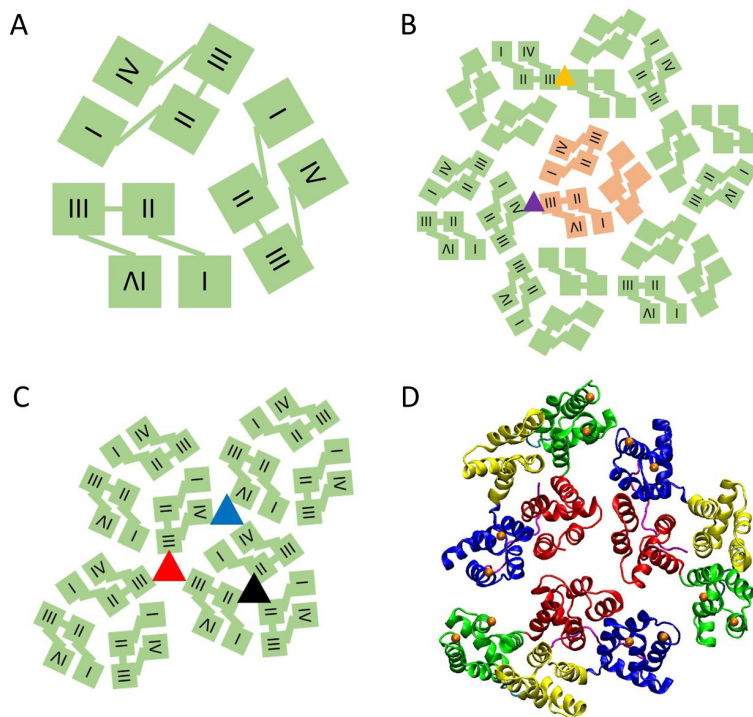


Рисунок 2. Формирование 2х мерной решетки Аннексина V. А. Схематическое изображение тримера аннексина V. Домены отмечены римскими цифрами. В. Схема решетки аннексина V р6. Зеленый, тример р6; оранжевый, тример без р6. Контакты между двумя тримерами р6 или р6 и не-р6 отмечены желтым и пурпурным треугольниками соответственно. С. Схема решетки р3 аннексина V. Центры разных типов тримеров отмечены красным, синим и черным треугольниками. D. Структура тримера аннексина V. Пурпурный, N-концевой хвост; синий, домен I; желтый, домен II; зеленый, домен III; красный, домен IV; оранжевый, ионы Ca^{2+} . Рисунок был создан в VMD с использованием структуры 1ANX [29] из банка данных PDB.

тримеров аннексина V: «тримеры р6» (зеленые, Рис. 2В) и центральные «тримеры, не относящиеся к р6» (оранжевые, Рис. 2В), которые структурно сходны. Предполагается, что оба типа имеют домен II аннексина V в своем центре (Рис. 2А), и этот тип тримера ранее визуализировали с помощью рентгеновской кристаллографии для аннексина V крысы [47].

В контактах между двумя тримерами р6 (желтый треугольник, Рис. 2В) участвуют домены III двух соседних мономеров. Аминокислотные остатки, которые могут участвовать в связывании, представляют собой Gln174, Gln177, Phe180, Thr215, Ile216, Ser217, и предполагается, что боковые цепи Phe180 образуют π -стэкинг. Расстояние между остовами белков составляет примерно 3 Å [46]. Такой же контакт ранее наблюдался между тримерами аннексина V крысы в решетке р6 [49].

Контакты между тримерами р6 и не-р6 включают домен IV (аминокислотные остатки Ser295, Tyr297, Ser298) из р6 и домен III (аминокислотные остатки Thr215, Ile216, Ser217, Gly218) из мономеров, не являющихся р6 (пурпурный треугольник, Рис. 2В). Расстояние между остовами белков значительно больше, чем для двух тримеров р6, и составляет примерно 6–8 Å. Тримеры, не являющиеся р6, обладают высокой степенью вращательной свободы и проявляют

вращательную диффузию [46]. Предполагается, что не-р6-тримеры обладают меньшим сродством к ионам Ca^{2+} , так как в опытах с истощением Ca^{2+} эти тримеры диссоциируют от мембраны раньше, чем р6-тримеры [46].

Для решетки р3 наблюдались три типа контактов между мономерами аннексина V человека [31]. Первый тип (черный треугольник, Рис. 2В) образует тример аннексина V с доменом II в центре, как это было для решетки р6. Солевые мостики образуются между кислыми аминокислотными остатками из доменов II и III (Asp162, Glu192, Glu138) одного мономера и основными аминокислотными остатками из домена I (Arg18, Lys29, Arg25, Lys58) другого [31]. Было обнаружено, что для одного и того же типа тримера аннексина V крысы остатки Arg23, Lys27 и Glu190 образуют контакты между мономерами, и эти остатки соответствуют Arg25, Lys29 и Glu192 аннексина V человека [47].

Контакты второго типа (красный треугольник, Рис. 2В) образуют тримеры аннексина V с доменом III в центре. Аминокислотные остатки Gln177 и Gln181 образуют кольцевую сеть водородных связей с молекулами воды в центре тримера. Остатки Trp187 из трех мономеров в обращенной наружу конформации группируются вблизи центра тримера [31].

Контакты третьего типа (синий треугольник,

Рис. 2В) образуют тримеры аннексина V с доменом IV в центре. Такой же тип тримера наблюдался ранее с помощью рентгеновской кристаллографии [29] (Рис. 2Г). Аминокислотные остатки Lys26 и Tyr297 одного мономера образуют связи с соответствующими остатками Glu223 и Ala293 другого [31].

Из этих данных можно сделать вывод, что разные домены одного мономера аннексина V могут образовывать связи с различными доменами другого мономера (домен III одного мономера с доменами III или IV или I другого; домен I одного мономера с доменами II или III) другого и так далее), а мультимеризация белка может включать образование множественных контактов между разными аминокислотами. В соответствии с этим выводом было обнаружено, что для конструирования мутанта аннексина V, лишенного способности к образованию тримеров, необходимо 4 или 5 различных мутаций [16]. Аннексин V крысы с мутациями Arg16Glu, Arg23Glu, Lys27Glu, Lys56Glu, Lys191Gly (эти остатки соответствуют Arg18, Arg25, Lys29, Lys58 и Lys193 аннексина V человека, для большинства из которых было показано участие в тримеризации [31]) не был способен формировать двумерные массивы, дополнительно подчеркивающие роль доменов I и III в процессе мультимеризации.

В дополнение к решеткам p6 и p3 на ФС-содержащих мембранах наблюдались некоторые другие кристаллические формы аннексина V, включая димеры тримеров аннексина V или тримеры тримеров. Эти формы сосуществуют с решеткой p6 [49].

Формирование 2D-решетки аннексина V является обратимым процессом, что было показано последовательным добавлением и истощением Ca^{2+} в растворе [46]. Добавление Ca^{2+} приводит к быстрому (в течение 5 с) формированию массива, но решетка может полностью раствориться при истощении запасов Ca^{2+} с помощью ЭДТА. Этот процесс может повторяться несколько раз. Границы образующихся решеток очень динамичны, и молекулы аннексина V постоянно связываются с решеткой и диссоциируют от нее с константами скоростей $k_a = 2,3 \text{ с}^{-1}$ и $k_d = 2,0 \text{ с}^{-1}$ соответственно [50]. Высота решетки аннексина на мембране составляла 2,5 нм над поверхностью мембраны [38,50,51] и уменьшалась примерно до 2,2 нм на мембранах с более высоким содержанием ФС [38].

Формирование решетки аннексина V на фосфолипидной мембране везикул приводит к уменьшению кривизны мембраны и образованию плоских фосфолипидных поверхностей [17,41]. Везикула меняет свою форму с округлой на многогранную, что наблюдали с помощью

криоэлектронной микроскопии [17].

Формирование решетки аннексина V может быть прервано присутствием различных белков, связывающихся с мембраной. Одновременное добавление аннексина V и другого члена семейства аннексинов, аннексина A4, в смеси 1:1 к ФС-содержащей мембране приводит к неравномерной упаковке отдельных тримеров аннексина V и A4 без образования решетки. Интересно, что добавление аннексина A4 даже в небольших концентрациях к предварительно сформированной решетке аннексина V нарушает ее регулярную структуру, но альтернативная ситуация, когда аннексин V добавляется к предварительно сформированной решетке A4, не изменяет существенно структуру решетки A4 [52].

Решетка 2D аннексина V может быть нарушена антифосфолипидными антителами [51].

Структурные изменения аннексина V и мембраны во время связывания

Имеются как экспериментальные [53], так и теоретические [45] доказательства того, что аннексин V не изменяет своей структуры в процессе связывания с мембраной. Молекула сохраняет изогнутую форму с выпуклой и вогнутой сторонами. Наблюдались лишь небольшие локальные различия между мембраносвязанными и несвязанными структурами [53]. Различия во вторичной структуре двух форм также незначительны [41]. Связанный с мембраной аннексин V демонстрирует меньшие колебания при моделировании молекулярной динамики [45], что согласуется со стабилизацией его структуры благодаря связыванию с мембраной [54].

Однако в процессе адсорбции аннексина V наблюдались серьезные изменения фосфолипидной мембраны.

В ранних исследованиях было установлено, что связывание аннексина V приводит к увеличению поверхностного давления монослоя фосфолипидов, его ригидности [55,56] и значительному упорядочению ацильных цепей фосфолипидов [56]. Также значительно снижается диффузионная способность ФС и ФХ [57].

Позднее были проведены детальные исследования с использованием атомно-силовой микроскопии и флуоресцентных методов. Было обнаружено, что бислоем, состоящий из ДОФХ/ДОФС = 50/50, испытывает усадку за счет адсорбции аннексина V [50]. Кроме того, уменьшение диаметра наблюдалось для однослойных везикул. Толщина мембран увеличивается после связывания аннексина V с 3,15 до 3,45 нм и соответствует более упорядоченному гелеобразному, а не жидкокристаллическому состоянию. Коэффициент диффузии фосфолипидов снижается всего до 15% от

исходной скорости [50]. Сопоставимые результаты (усадка мембраны и снижение коэффициента диффузии) были получены при молекулярно-динамическом моделировании мембраны со связанными и фиксированными ионами Ca^{2+} в положениях, соответствующих положениям в связанном с мембраной тримере аннексина V [50]. Было высказано предположение, что связывание аннексина V приводит к увеличению локальной концентрации Ca^{2+} на поверхности мембраны до 606 мМ, и такая высокая концентрация ионов может изменять свойства бислоя [50].

Связывание аннексина V вызывает локальное искривление мембраны из-за изогнутой формы молекулы [45]. В крупномасштабном процессе на мембране со свободными краями эта индукция кривизны приводит к скручиванию мембраны [58]. Скручивание мембраны начинается с нескольких точек на свободном крае и приводит к образованию одного основного валика, параллельного краю мембраны, поэтому было предложено, чтобы процесс был кооперативным [58]. В отличие от формирования двумерной решетки, скручивание мембраны, индуцированное аннексином V, не нарушается присутствием аннексина A4 [52]. Однако следует отметить, что и аннексин V, и аннексин A4 способны вызывать скручивание мембраны.

Было высказано предположение, что свойства аннексина V, связанные со стабилизацией и вращением мембраны, важны для процесса восстановления мембраны [52].

Связывание аннексина V с различными белками

В ранних исследованиях было обнаружено, что аннексин V способен связываться с мембраной тромбина или A23187-стимулированных тромбоцитов двумя различными путями [59]. Первый способ реализуется в присутствии высоких концентраций Ca^{2+} и соответствует обсуждавшемуся ранее связыванию с мембраной. Второй путь реализуется при низких концентрациях Ca^{2+} и связанном белке, устойчивом к действию ЭГТА. На основании этих данных было сделано предположение, что аннексин V способен образовывать комплекс с мембранным белком [59]. Позднее было обнаружено, что аннексин V локализуется с актином в стимулированных тромбоцитах, и был идентифицирован комплекс актина и аннексина V массой 85 кДа [60]. Ассоциация является Ca^{2+} -зависимой, и было показано, что аннексин V связывается с изоформой γ -актина [61].

Аннексин V способен связывать аннексин A2. Связывание не зависит от фосфолипидов и происходит в растворе, но требует миллимолярной концентрации Ca^{2+} . Как мономерная, так и тримерная формы аннексина A2 связывают

аннексин V, и это взаимодействие может быть ингибировано добавлением низкомолекулярного гепарина [62].

2. Функции аннексина V

Ингибирование свертывания крови

В 1985 г. было обнаружено, что аннексин V способен ингибировать тканевой фактор (ТФ) или фактор Ха, инициирующий свертывание плазмы крови, но не влияет на расщепление фибриногена тромбином [10]. Его предполагаемое ингибирующее действие основано на способности высокоаффинного связывания с фосфолипидными мембранами. Реакции свертывания крови требуют наличия отрицательно заряженных фосфолипидных мембран для максимальной эффективности реакции [63,64], а механизм этих мембранозависимых реакций включает стадию ассоциации белков с мембраной, двумерную диффузию на мембране поверхностных и связанных с мембраной активных комплексов [65-67]. Связывание аннексина V с мембраной может прерывать эти процессы.

Антикоагулянтный эффект аннексина V широко изучался.

Аннексин V ингибирует активацию протромбина протромбиназным комплексом (образованным FVa и FXa) дозозависимым образом. Более высокие концентрации аннексина V приводят к более высокой степени ингибирования [10,68,69]. Было показано, что связывание аннексина V не может полностью вытеснить с поверхности везикул факторы свертывания крови (фактор Ха, Va или тромбин) и на мембране остается достаточное количество факторов для функционирования протромбиназы, поэтому был сделан вывод, что ингибирование реакции связано с образованием 2D-решетки аннексина V [17]. Такая решетка могла бы замедлять диффузию факторов на поверхности мембраны и, следовательно, их столкновения и связывание. Степень ингибирования зависит от кривизны мембраны, при этом ингибирование более выражено на поверхности плоских бислоев, чем на SUV [17]. Аннексин V ингибирует активность протромбиназы на поверхности апоптотических гладкомышечных клеток [70] и на линиях раковых клеток [68,69].

Активация FX внутренним теназным комплексом (образованным FVIIIa и FIXa) ингибируется аннексином V на поверхности различных клеточных линий [68,69,71]. Было продемонстрировано, что добавление аннексина V снижает связывание фактора VIIIa с LUV, содержащими 10% ПОФС, с остальной частью ПОФХ. Эффект зависит от концентрации аннексина V и более заметен при более высоких

концентрациях [72]. Для везикул с 15% ФС зависимость связывания FVIIIa от концентрации аннексина V более сложная. Присутствие низких концентраций аннексина приводит к умеренному увеличению связывания FVIIIa, но более высокие концентрации ингибируют связывание. Зависимости ингибирующего эффекта от концентрации аннексина V не могут быть объяснены простой моделью конкуренции за сайты связывания и требуют более сложной модели «фосфолипидного экранирования» аннексином V [72].

Активность внешней теназы (образованной FVIIa и тканевым фактором TF) на поверхности апоптотических гладкомышечных клеток ингибируется аннексином V [70].

Для внешней теназы был предложен еще один альтернативный механизм ингибирования. В макрофагах, стимулированных этопозидом (клеточная линия THP-1), было обнаружено, что аннексин V может быть интернализован и индуцирует интернализацию TF [73]. Интернализированный TF и аннексин V совместно локализуются в эндоцитарных везикулах. Интернализация TF приводит к снижению прокоагулянтной активности TF клеточной поверхности. *In vivo* на мышинной модели было показано, что экзогенно добавленный аннексин V значительно снижает экспрессию TF на поверхности гладкомышечных клеток после механического повреждения по сравнению с ситуацией без добавления аннексина V [73].

Предполагается, что антикоагулянтная активность аннексина V играет роль в предотвращении тромботических процессов в плаценте [74]. Антифосфолипидные антитела ингибируют антикоагулянтную функцию аннексина V из-за нарушения двумерной решетки [51].

Аннексин V в роли канала для Ca^{2+}

В ранних исследованиях было установлено, что аннексин V способен транспортировать ионы Ca^{2+} через мембрану фосфолипидных везикул и было высказано предположение, что аннексин V формирует Ca^{2+} -каналы [33,44,75]. Эти каналы являются потенциал-зависимыми и демонстрируют селективность в отношении ионов Ca^{2+} [33,55].

Роль отдельных аминокислотных остатков в процессе ионного транспорта исследовали с помощью точечных мутаций белка и структурных исследований. В рентгеноструктурном исследовании было высказано предположение, что остатки T33, E35 и K70, L73, E78 (табл. 1) образуют промежуточные сайты связывания Ca^{2+} на поверхности белка и, таким образом, играют роль в ионном транспорте [28]. Остаток Glu95 отвечает за ионную селективность, так как

мутант Glu95Ser демонстрирует более высокую проницаемость для ионов Na^{+} и K^{+} . Кроме того, он демонстрирует несколько сниженный поток Ca^{2+} через канал и другую зависимость тока от напряжения по сравнению с аннексином V дикого типа [33,48]. Мутация Glu112Gly приводит к таким же изменениям активности канала, как и для Glu95Ser (потеря селективности в отношении Ca^{2+} и другие вольтамперные зависимости). Кроме того, мутант Glu112Gly демонстрирует два уровня транспорта ионов: высокий, что соответствует уровню аннексина V дикого типа, и низкий, причем это свойство не проявлялось у Glu95Ser или аннексина V дикого типа, которые имеют только один уровень транспорта ионов. транспорт [76]. Оба остатка Glu95 и Glu112 располагаются внутри гидрофильной поры в центре аннексина V.

Glu78 и Glu17 играют роль в транспорте ионов, поскольку их мутации в Gln и Gly значительно изменяют кинетику транспорта [33]. Оба мутанта имеют два уровня ионного транспорта (высокий и низкий), а двойной мутант Glu78Gln/Glu17Gly проявляет только меньший уровень. Мутант Glu17Gly обеспечивает значительно более медленный вход Ca^{2+} в фосфолипидный везикул [75].

Интересно, что полученные структуры решеток р6 из аннексина V дикого типа или мутантных (Glu95Ser, Glu112Gly, Glu17Gly и Glu78Gln) одинаковы, и основное различие между ними находится вокруг мутантного остатка [33,48,76].

N-концевой домен аннексина V необходим для активности ионного канала, поскольку мутантный аннексин V без 14 N-концевых аминокислот не поддерживает поток Ca^{2+} через мембрану [75].

Предполагается, что гидрофильная пора в центре мономера аннексина V образует путь транспорта ионов через молекулу. Солевые мостики внутри поры образуют «ворота» [55]. Гипотезы о путях открытия ионного пути включают шарнирное движение молекулы, приводящее к изменению межмодульного угла, открывающего пору. Также было предложено альтернативное образование солевого мостика [28,55,77]. Шарнирное движение доменов аннексина V наблюдали при моделировании молекулярной динамики. Угол между двумя частями молекулы был больше в Ca^{2+} -связанной форме аннексина V, чем в Ca^{2+} -несвязанной, и, таким образом, Ca^{2+} -связанная форма могла представлять собой более открытую конформацию канала. Однако время моделирования было относительно небольшим [77]. Предполагается, что свободная диффузия через поры невозможна. Было обнаружено, что ширина канала составляет 0,8 Å в наиболее открытой конформации, и эти размеры все еще недостаточны для прохождения ионов, поэтому было высказано предположение,

что можно ожидать еще больших шарнирных движений аннексина V, чем наблюдаемые при моделировании [77].

Точный механизм транспорта ионов аннексином V в настоящее время неизвестен, но существуют две гипотезы. К первой относятся структурные изменения белка и его глубокое проникновение в поверхность мембраны [78]. Часто подчеркивается, что аннексин V является растворимым белком и имеет очень мало гидрофобных участков на своей поверхности при нейтральном pH = 7,4 [35], поэтому его встраивание в мембрану кажется неблагоприятным и может потребовать обширных структурных изменений молекулы [41]. Однако было показано, что аннексин V не демонстрирует существенных изменений структуры после связывания с мембраной [41] (подробно обсуждается в предыдущих разделах). Кроме того, он связывается преимущественно с головными группами липидов и существенно не нарушает липидные хвосты, что противоречит модели встраивания в мембрану [41]. С другой стороны, гидрофобность белка существенно возрастает при кислом pH = 4,0, и эти условия могут способствовать внедрению мембраны [35], так что возможность этого процесса в других условиях остается под вопросом.

Вторая гипотеза включает изменение структуры мембраны и процесса электропорации, обратимое порообразование мембраны под действием внешнего электрического поля [55] (последний обзор электропорации см. в [79]). Было показано, что Ca²⁺-связанный аннексин V способен создавать электрическое поле в области контакта белок-мембрана, и это поле достаточно сильное, чтобы индуцировать образование пор [55].

Основным ограничением ранних исследований активности переноса ионов аннексина V является использование чрезвычайно кислых фосфолипидных мембран (ФС/ФЭ = 90/10) или небольшие участки мембраны на микропипетках. Совсем недавно активность аннексиновых V-каналов изучали на фосфолипидных везикулах различного состава (25, 50, 75 или 90% ФС с остальным ФЭ) [80]. Выявлено, что значительный поток Ca²⁺ через мембрану существует только для везикул ФС/ФЭ = 90/10, но не наблюдается на везикулах с меньшим содержанием ФС. На везикулах, состоящих из ФГ/ФЭ или ФИ/ФЭ, аннексин V не проявляет активности Ca²⁺-канала, и только везикулы, состоящие из ФА/ФЭ = 90/10, поддерживают поток Ca²⁺ через мембрану [80]. Эти данные свидетельствуют о том, что для транспорта Ca²⁺ аннексином V необходима кислая поверхность. Однако это исследование было выполнено для куриного аннексина V, свойства которого отличаются от свойств человеческого

аннексина V (например, человеческий аннексин V не способствует агрегации пузырьков, в то время как куриный аннексин V способствует [42,81]), таким образом, канал аннексина V человека активен на мембранах разного состава может быть разной.

В некоторых исследованиях было отмечено, что авторам не удалось обнаружить активность V канала аннексина [82]. Однако наблюдалась утечка Fura-2 из кислых фосфолипидных везикул (ФС/ФЭ = 90/10) в присутствии высокой (2,5 мМ) концентрации Ca²⁺ или аннексина V без Ca²⁺ [82]. На основании этих данных была выдвинута гипотеза, что в растворе, не содержащем Ca²⁺, аннексин V может вызывать потерю целостности мембраны, но этот эффект ослабевает в присутствии умеренных концентраций Ca²⁺.

Заклучение

Аннексин V представляет собой белок с разнообразными функциями, и большинство из них зависит от его способности связываться с мембраной. Однако практически неизвестно, выполняет ли аннексин эти функции в клетках в присутствии многих других мембраносвязывающих белковина мембранах, значительно отличающихся по составу от искусственных. Белок широко используется в качестве маркера PS-позитивных клеток, но существуют доказательства того, что он способен связываться с различными типами фосфолипидов.

Таким образом, необходимы дополнительные исследования специфичности фосфолипидов аннексина V и функций белка.

Финансирование

Исследование было поддержано грантом Рссийского Научного Фонда №21-45-00012.

Список литературы

1. Cho W, Stahelin R V. Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2005;34:119–51. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.33.110502.133337>.
2. Protty MB, Jenkins PV, Collins PW, O'Donnell VB. The role of procoagulant phospholipids on the surface of circulating blood cells in thrombosis and haemostasis. *Open Biol* 2022;12:210318. <https://doi.org/10.1098/rsob.210318>.
3. Mirsaeidi M, Gidfar S, Vu A, Schraufnagel D. Annexins family: insights into their functions and potential role in pathogenesis of sarcoidosis. *J Transl Med* 2016;14:89. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0843-7>.
4. Johnston PA, Perin MS, Reynolds GA, Wasserman SA, Südhof TC. Two novel annexins from *Drosophila melanogaster*. Cloning, characterization, and differential expression in development. *J Biol Chem* 1990;265:11382–8.
5. Smallwood M, Keen JN, Bowles DJ. Purification and partial sequence analysis of plant annexins. *Biochem J* 1990;270:157–61. <https://doi.org/10.1042/bj2700157>.

6. Martoglio B, Dobberstein B. Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* 1998;8:410–5. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(98\)01360-9](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(98)01360-9).
7. van Genderen HO, Kenis H, Hofstra L, Narula J, Reutelingsperger CPM. Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:953–63. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.030>.
8. Popa SJ, Stewart SE, Moreau K. Unconventional secretion of annexins and galectins. *Semin Cell Dev Biol* 2018;83:42–50. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2018.02.022>.
9. Bohn H, Kraus W. [Isolation and characterization of a new placenta specific protein (PP10) (author's transl)]. *Arch Gynecol* 1979;227:125–34. <https://doi.org/10.1007/BF02103286>.
10. Reutelingsperger CP, Hornstra G, Hemker HC. Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur J Biochem* 1985;151:625–9. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb09150.x>.
11. Kaneko N, Matsuda R, Hosoda S, Kajita T, Ohta Y. Measurement of plasma annexin V by ELISA in the early detection of acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 1996;251:65–80. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(96\)06294-8](https://doi.org/10.1016/0009-8981(96)06294-8).
12. Roldán V, Marín F, Pineda J, Marco P, Corral J, Climent V, et al. [Annexin V levels in survivors of early myocardial infarction]. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:1230–4. [https://doi.org/10.1016/s0300-8932\(02\)76794-8](https://doi.org/10.1016/s0300-8932(02)76794-8).
13. Rand JH, Arslan AA, Wu X-X, Wein R, Mulholland J, Shah M, et al. Reduction of circulating annexin A5 levels and resistance to annexin A5 anticoagulant activity in women with recurrent spontaneous pregnancy losses. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:182–8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.05.034>.
14. Hrycek A, Ciešlik P. Annexin A5 and anti-annexin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 2012;32:1335–42. <https://doi.org/10.1007/s00296-011-1793-2>.
15. Reviakine I, Bergsma-Schutter W, Morozov AN, Brisson A. Two-Dimensional Crystallization of Annexin A5 on Phospholipid Bilayers and Monolayers: A Solid–Solid Phase Transition between Crystal Forms. *Langmuir* 2001;17:1680–6. <https://doi.org/10.1021/la001342l>.
16. Bouter A, Gounou C, Bérat R, Tan S, Gallois B, Granier T, et al. Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair. *Nat Commun* 2011;2:270. <https://doi.org/10.1038/ncomms1270>.
17. Andree HA, Stuart MC, Hermens WT, Reutelingsperger CP, Hemker HC, Frederik PM, et al. Clustering of lipid-bound annexin V may explain its anticoagulant effect. *J Biol Chem* 1992;267:17907–12.
18. Kurschus FC, Pal PP, Bäuml P, Jenne DE, Wiltschi B, Budisa N. Gold fluorescent annexin A5 as a novel apoptosis detection tool. *Cytom Part A J Int Soc Anal Cytol* 2009;75:626–33. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20737>.
19. Podoplelova NA, Sveshnikova AN, Kotova YN, Eckly A, Receveur N, Nechipurenko DY, et al. Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood* 2016;128:1745–55. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-02-696898>.
20. Morozova DS, Martyanov AA, Obydennyi SI, Korobkin J-JD, Sokolov AV, Shamova EV, et al. Ex vivo observation of granulocyte activity during thrombus formation. *BMC Biol* 2022;20:32. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01238-x>.
21. Nechipurenko DY, Receveur N, Yakimenko AO, Shepelyuk TO, Yakusheva AA, Kerimov RR, et al. Clot Contraction Drives the Translocation of Procoagulant Platelets to Thrombus Surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019;39:37–47. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311390>.
22. Boersma HH, Kietselaer BLJH, Stolk LML, Bennaghmouch A, Hofstra L, Narula J, et al. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med* 2005;46:2035–50.
23. Qin X, Jiang H, Liu Y, Zhang H, Tian M. Radionuclide imaging of apoptosis for clinical application. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2022;49:1345–59. <https://doi.org/10.1007/s00259-021-05641-4>.
24. Huber R, Römisch J, Paques EP. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO J* 1990;9:3867–74. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07605.x>.
25. Colloc'h N, Sopkova-de Oliveira Santos J, Retailleau P, Vivarès D, Bonneté F, Langlois d'Estainto B, et al. Protein crystallography under xenon and nitrous oxide pressure: comparison with in vivo pharmacology studies and implications for the mechanism of inhaled anesthetic action. *Biophys J* 2007;92:217–24. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.093807>.
26. Ortlund E, Chai G, Genge B, Wu LNY, Wuthier R, Lebioda L. Crystal structure of chicken annexin A5 in complex with functional modifiers Ca²⁺ and Zn²⁺ reveal Zn²⁺-induced formation of non-planar assemblies. *Annexins* 2004;1:183–90.
27. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 2021;596:583–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
28. Huber R, Berendes R, Burger A, Schneider M, Karshikov A, Luecke H, et al. Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement: Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins. *J Mol Biol* 1992;223:683–704. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90984-R](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90984-R).
29. Sopkova J, Renouard M, Lewit-Bentley A. The Crystal Structure of a New High-calcium Form of Annexin V. *J Mol Biol* 1993;234:816–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1627>.
30. Concha NO, Head JF, Kaetzel MA, Dedman JR, Seaton BA. Rat annexin V crystal structure: Ca²⁺-induced conformational changes. *Science* 1993;261:1321–4. <https://doi.org/10.1126/science.8362244>.
31. Hong S, Na S, Kim O-H, Jeong S, Oh B-C, Ha N-C. High-resolution structures of annexin A5 in a two-dimensional array. *J Struct Biol* 2020;209:107401. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.10.003>.
32. Fezoua-Boubegiten Z, Desbat B, Brisson A, Gounou C, Laguerre M, Lecomte S. Effect of Mg²⁺ versus Ca²⁺ on the behavior of annexin A5 in a membrane-bound state. *Eur Biophys J* 2011;40:641–9. <https://doi.org/10.1007/s00249-010-0665-0>.
33. Burger A, Voges D, Demange P, Perez CR, Huber R, Berendes R. Structural and electrophysiological analysis of annexin V mutants. Mutagenesis of human annexin V, an in vitro voltage-gated calcium channel, provides information about the structural features of the ion pathway, the voltage sensor and the ion selectivity filter. *J Mol Biol* 1994;237:479–99. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1249>.
34. Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem* 1990;265:4923–8.

35. Köhler G, Hering U, Zschörnig O, Arnold K. Annexin V interaction with phosphatidylserine-containing vesicles at low and neutral pH. *Biochemistry* 1997;36:8189–94. <https://doi.org/10.1021/bi9703960>.
36. Tait JF, Gibson D. Phospholipid binding of annexin V: effects of calcium and membrane phosphatidylserine content. *Arch Biochem Biophys* 1992;298:187–91. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90111-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90111-9).
37. Stuart MC, Reutelingsperger CP, Frederik PM. Binding of annexin V to bilayers with various phospholipid compositions using glass beads in a flow cytometer. *Cytometry* 1998;33:414–9.
38. Lu J, Le Brun AP, Chow SH, Shiota T, Wang B, Lin T-W, et al. Defining the structural characteristics of annexin V binding to a mimetic apoptotic membrane. *Eur Biophys J* 2015;44:697–708. <https://doi.org/10.1007/s00249-015-1068-z>.
39. Jeon JY, Hwang SY, Cho SH, Choo J, Lee EK. Effect of cholesterol content on affinity and stability of factor VIII and annexin V binding to a liposomal bilayer membrane. *Chem Phys Lipids* 2010;163:335–40. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.01.005>.
40. Shi J, Shi Y, Waehrens LN, Rasmussen JT, Heegaard CW, Gilbert GE. Lactadherin detects early phosphatidylserine exposure on immortalized leukemia cells undergoing programmed cell death. *Cytom Part A J Int Soc Anal Cytol* 2006;69:1193–201. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20345>.
41. Swairjo BA, Roberts MF, Campos MB, Dedman JR, Seaton BA. Annexin V binding to the outer leaflet of small unilamellar vesicles leads to altered inner-leaflet properties: ³¹P- and ¹H-NMR studies. *Biochemistry* 1994;33:10944–50. <https://doi.org/10.1021/bi00202a013>.
42. Lambert O, Gerke V, Bader M-F, Porte F, Brisson A. Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy. Edited by M. F. Moody. *J Mol Biol* 1997;272:42–55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1183>.
43. Ayala-Sanmartin J. Cholesterol enhances phospholipid binding and aggregation of annexins by their core domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:72–9. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4748>.
44. Matsuda R, Kaneko N, Horikawa Y. Presence and comparison of Ca²⁺ transport activity of annexins I, II, V, and VI in large unilamellar vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:499–503. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7177>.
45. Chen Z, Mao Y, Yang J, Zhang T, Zhao L, Yu K, et al. Characterizing the binding of annexin V to a lipid bilayer using molecular dynamics simulations. *Proteins* 2014;82:312–22. <https://doi.org/10.1002/prot.24389>.
46. Miyagi A, Chipot C, Rangl M, Scheuring S. High-speed atomic force microscopy shows that annexin V stabilizes membranes on the second timescale. *Nat Nanotechnol* 2016;11:783–90. <https://doi.org/10.1038/nnano.2016.89>.
47. Mo Y, Campos B, Mealy TR, Commodore L, Head JF, Dedman JR, et al. Interfacial Basic Cluster in Annexin V Couples Phospholipid Binding and Trimer Formation on Membrane Surfaces*. *J Biol Chem* 2003;278:2437–43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M210286200>.
48. Berendes R, Voges D, Demange P, Huber R, Burger A. Structure-function analysis of the ion channel selectivity filter in human annexin V. *Science* 1993;262:427–30. <https://doi.org/10.1126/science.7692599>.
49. Oling F, Bergsma-Schutter W, Brisson A. Trimers, dimers of trimers, and trimers of trimers are common building blocks of annexin a5 two-dimensional crystals. *J Struct Biol* 2001;133:55–63. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4337>.
50. Lin Y-C, Chipot C, Scheuring S. Annexin-V stabilizes membrane defects by inducing lipid phase transition. *Nat Commun* 2020;11:230. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14045-w>.
51. Rand JH, Wu X-X, Quinn AS, Chen PP, McCrae KR, Bovill EG, et al. Human monoclonal antiphospholipid antibodies disrupt the annexin A5 anticoagulant crystal shield on phospholipid bilayers: evidence from atomic force microscopy and functional assay. *Am J Pathol* 2003;163:1193–200. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63479-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63479-7).
52. Mularski A, Sønder SL, Heitmann ASB, Nylandsted J, Simonsen AC. Simultaneous membrane binding of Annexin A4 and A5 suppresses 2D lattice formation while maintaining curvature induction. *J Colloid Interface Sci* 2021;600:854–64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.05.067>.
53. Oling F, Santos JSO, Govorkhina N, Mazères-Dubut C, Bergsma-Schutter W, Oostergetel G, et al. Structure of Membrane-bound Annexin A5 Trimers: A Hybrid Cryo-EM - X-ray Crystallography Study. *J Mol Biol* 2000;304:561–73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4183>.
54. Wu F, Flach CR, Seaton BA, Mealy TR, Mendelsohn R. Stability of annexin V in ternary complexes with Ca²⁺ and anionic phospholipids: IR studies of monolayer and bulk phases. *Biochemistry* 1999;38:792–9. <https://doi.org/10.1021/bi9819677>.
55. Karshikov A, Berendes R, Burger A, Cavalié A, Lux H-D, Huber R. Annexin V membrane interaction: an electrostatic potential study. *Eur Biophys J* 1992;20:337–44. <https://doi.org/10.1007/BF00196592>.
56. Wu F, Gericke A, Flach CR, Mealy TR, Seaton BA, Mendelsohn R. Domain structure and molecular conformation in annexin V/1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphate/Ca²⁺ aqueous monolayers: a Brewster angle microscopy/infrared reflection-absorption spectroscopy study. *Biophys J* 1998;74:3273–81. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)78034-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)78034-8).
57. Saurel O, Cézanne L, Milon A, Tocanne JF, Demange P. Influence of annexin V on the structure and dynamics of phosphatidylcholine/phosphatidylserine bilayers: a fluorescence and NMR study. *Biochemistry* 1998;37:1403–10. <https://doi.org/10.1021/bi971484n>.
58. Boye TL, Jeppesen JC, Maeda K, Pezeshkian W, Solovyeva V, Nylandsted J, et al. Annexins induce curvature on free-edge membranes displaying distinct morphologies. *Sci Rep* 2018;8:10309. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28481-z>.
59. Trotter PJ, Orchard MA, Walker JH. Ca²⁺ concentration during binding determines the manner in which annexin V binds to membranes. *Biochem J* 1995;308 (Pt 2):591–8. <https://doi.org/10.1042/bj3080591>.
60. Tzima E, Trotter PJ, Orchard MA, Walker JH. Annexin V Binds to the Actin-Based Cytoskeleton at the Plasma Membrane of Activated Platelets. *Exp Cell Res* 1999;251:185–93. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/excr.1999.4553>.
61. Tzima E, Trotter PJ, Orchard MA, Walker JH. Annexin V relocates to the platelet cytoskeleton upon activation and binds to a specific isoform of actin. *Eur J Biochem* 2000;267:4720–30. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01525.x>.
62. Brooks ND, Grundy JE, Lavigne N, Derry MC, Restall CM, MacKenzie CR, et al. Ca²⁺-dependent and phospholipid-independent binding of annexin 2 and annexin 5. *Biochem J* 2002;367:895–900. <https://doi.org/10.1042/BJ20020997>.

63. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochim Biophys Acta* 1998;1376:433–53.
64. Gajsiewicz JM, Morrissey JH. Structure-Function Relationship of the Interaction between Tissue Factor and Factor VIIa. *Semin Thromb Hemost* 2015;41:682–90. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1564044>.
65. Butenas S, Mann KG, Butenas. Blood Coagulation. *Biochem* 2002;67:3–12. <https://doi.org/10.1023/A:1013985911759>.
66. Kovalenko TA, Pantelev MA, Sveshnikova AN. Substrate delivery mechanism and the role of membrane curvature in factor X activation by extrinsic tenase. *J Theor Biol* 2017;435:125–33. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.09.015>.
67. Dahlbäck B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood* 2008;112:19–27. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-077909>.
68. Fernandes RS, Kirszberg C, Rumjanek VM, Monteiro RQ. On the molecular mechanisms for the highly procoagulant pattern of C6 glioma cells. *J Thromb Haemost* 2006;4:1546–52. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01985.x>.
69. Kirszberg C, Lima LG, Da Silva de Oliveira A, Pickering W, Gray E, Barrowcliffe TW, et al. Simultaneous tissue factor expression and phosphatidylserine exposure account for the highly procoagulant pattern of melanoma cell lines. *Melanoma Res* 2009;19:301–8. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e32832e40fe>.
70. Brisset A-C, Terrisse A-D, Dupouy D, Tellier L, Pech S, Navarro C, et al. Shedding of active tissue factor by aortic smooth muscle cells (SMCs) undergoing apoptosis. *Thromb Haemost* 2003;90:511–8. <https://doi.org/10.1160/TH02-12-0291>.
71. Pickering W, Gray E, Goodall AH, Ran S, Thorpe PE, Barrowcliffe TW. Characterization of the cell-surface procoagulant activity of T-lymphoblastoid cell lines. *J Thromb Haemost* 2004;2:459–67. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00607.x>.
72. Engelke H, Lippok S, Dorn I, Netz RR, Rädler JO. FVIII binding to PS membranes differs in the activated and non-activated form and can be shielded by annexin A5. *J Phys Chem B* 2011;115:12963–70. <https://doi.org/10.1021/jp2048579>.
73. Ravassa S, Bennaghmouch A, Kenis H, Lindhout T, Hackeng T, Narula J, et al. Annexin A5 down-regulates surface expression of tissue factor: a novel mechanism of regulating the membrane receptor repertoire. *J Biol Chem* 2005;280:6028–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411710200>.
74. Rand JH, Wu XX, Andree HA, Lockwood CJ, Guller S, Scher J, et al. Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome--a possible thrombogenic mechanism. *N Engl J Med* 1997;337:154–60. <https://doi.org/10.1056/NEJM199707173370303>.
75. Berendes R, Burger A, Voges D, Demange P, Huber R. Calcium influx through annexin V ion channels into large unilamellar vesicles measured with fura-2. *FEBS Lett* 1993;317:131–4. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81507-v](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81507-v).
76. Liemann S, Benz J, Burger A, Voges D, Hofmann A, Huber R, et al. Structural and Functional Characterisation of the Voltage Sensor in the Ion Channel Human Annexin V. *J Mol Biol* 1996;258:555–61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0268>.
77. Cregut D, Drin G, Liautard JP, Chiche L. Hinge-bending motions in annexins: molecular dynamics and essential dynamics of apo-annexin V and of calcium bound annexin V and I. *Protein Eng* 1998;11:891–900. <https://doi.org/10.1093/protein/11.10.891>.
78. Pollard HB, Guy HR, Arispe N, de la Fuente M, Lee G, Rojas EM, et al. Calcium channel and membrane fusion activity of synexin and other members of the Annexin gene family. *Biophys J* 1992;62:15–8. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81764-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81764-2).
79. Kotnik T, Rems L, Tarek M, Miklavčič D. Membrane Electroporation and Electropermeabilization: Mechanisms and Models. *Annu Rev Biophys* 2019;48:63–91. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115451>.
80. Kirsch T, Nah HD, Demuth DR, Harrison G, Golub EE, Adams SL, et al. Annexin V-mediated calcium flux across membranes is dependent on the lipid composition: implications for cartilage mineralization. *Biochemistry* 1997;36:3359–67. <https://doi.org/10.1021/bi9626867>.
81. Turnay J, Guzmán-Aránguez A, Lecona E, Barrasa JI, Olmo N, Lizarbe MA. Key role of the N-terminus of chicken annexin A5 in vesicle aggregation. *Protein Sci* 2009;18:1095–106. <https://doi.org/10.1002/pro.119>.
82. Goossens EL, Reutelingsperger CP, Jongsma FH, Kraayenhof R, Hermens WT. Annexin V perturbs or stabilises phospholipid membranes in a calcium-dependent manner. *FEBS Lett* 1995;359:155–8. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00032-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00032-5).

Системная биология и физиология: между 2022 и 2023

Пантелеев М.А.^{1-3#}

1. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия
2. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
3. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва, Россия

Автор для переписки: editor@sbpreports.ru

Получено: 30.12.2022

Принято к публикации: 30.12.2022

Опубликовано: 31.12.2022

DOI: [10.52455/sbpr.01.202263015](https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202263015)

Первый год является решающим в жизни любого журнала. Несмотря на то, что официальное существование наш журнал “Системная биология и физиология” начал только в 2022 году, первые статьи были приняты к печати в английской версии больше года назад [1] и в нем уже вышло семь номеров. В 2022 году была успешно зарегистрирована и запущена российская версия. Первый номер включил часть статей из английской версии [2–9], а настоящая статья открывает уже второй номер, содержащий новые оригинальные статьи.

Помимо десятков новых статей, которые уже начали цитироваться как в международной печати, так и в социальных сетях, в минувшем году наш журнал стал центром организации одноименной конференции (https://sbpreports.ru/conference/sbsp_2022), уже третьей по счету. Начиная с этого года, конференция стала тематической: первыми в очереди тем стали внутриклеточная сигнализация и регуляция, от цитоскелета и метаболизма до механизмов клеточного старения и смерти. Как и в прошлом году, труды конференции были опубликованы в нашем журнале.

Мне хотелось бы выразить глубокую благодарность редакционной и технической команде журнала и конференции, усилия и энтузиазм которых сделали возможным появление и существование журнала. Спасибо всем нашим авторам и рецензентам за их труды! Поздравляю всех с Новым годом и желаю нам всем успешного развития в 2023 году.

Искренне Ваш,

Главный редактор журнала “Системная биология и физиология”, директор ЦТП ФХФ РАН,
Пантелеев Михаил Александрович

Список литературы

1. Panteleev M. Systems Biology and Physiology Reports in 2021: a yearly report. SBPR 2021;1:20–1. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202104014>.

2. Kokhan A, Zdanevich S, Prokofev I, Gorudko I, Shamova E. Patch-clamp technique for studying ion channels in activated platelets. SBPR 2021;1:3–11. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202101012>.
3. Alexandrova V, Anisimov M, Eltsov I, Kilina A, Lopanskaia I, Makarova L, et al. Avoiding common problems with statistical analysis of biological experiments using a simple nested data simulator. SBPR 2021;1:12–9. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202101013>.
4. Sveshnikova A, Stepanyan M, Panteleev M. Platelet functional responses and signalling: the molecular relationship. Part 1: responses. SBPR 2021;1:20–8. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202101014>.
5. Garzon Dasgupta A. STIM1-ORAI1 direct interaction cannot govern store-operated calcium entry (SOCE) in platelets. SBPR 2021;1:11–6. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202102012>.
6. Asadov A, Chudinov I, Nechipurenko D. In vitro models of thrombosis and hemostasis. SBPR 2021;1:23–32. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202102014>.
7. Stepanyan M, Martyanov A, An O, Boldova A, Roumiantsev S, Rummyantsev A, et al. A strong correlation exists between platelet consumption and platelet hyperactivation in COVID-19 patients. Pilot study of the patient cohort from CCH RAS Hospital (Troitsk). SBPR 2021;1:1–10. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202102011>.
8. Tabachnik A. Presence of PI-rich vesicles is required for the PLC ζ activation according to mathematical modeling. SBPR 2021;1:17–22. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202102013>.
9. Anisimov M. Approaches to visualize microtubule dynamics in vitro. SBPR 2022;1:1–16. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202206011>.