

ДН / 236602

20 06 40

(049)

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. А.В. ПАЛЛАДИНА

ЖЕРНОСЕКОВ ДМИТРИЙ ДАНИЛОВИЧ

УДК 616.155.2+576.522+616.155.2

**ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ АДГЕЗИВНЫХ БЕЛКОВ В
МЕЖКЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТАХ ТКАНЕЙ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В
ОНТОГЕНЕЗЕ И ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ**

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Киев – 2019

ДН 1 236604 (019)

Диссертация является рукописью

Работа выполнена в Институте биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины и на кафедре биохимии Днепропетровского национального университета

Научный консультант: доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Гриненко Татьяна Викторовна,
Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН
Украины, заведующая отделом химии и биохимии
ферментов

**Официальные
оппоненты:** доктор биологических наук,
Калачиук Лилия Григорьевна,
ГУ «Национальный университет биоресурсов и
природопользования Украины»,
профессор кафедры биохимии и физиологии им.
акад. М.Ф. Гулого.

доктор биологических наук, профессор,
Варбанец Людмила Дмитриевна,
Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.
Заболотного НАН Украины, заведующая отделом
биохимии микроорганизмов

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Верёвка Сергей Викторович,
ГУ «Институт отоларингологии
им. проф. А.С. Коломийченко НАМН Украины»,
Заведующий лабораторией биохимии.

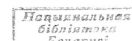
Защита состоится «28» января 2019 г. в 14 часов на заседании
специализированного ученого Совета Д 26.240.01 в Институте биохимии им.
А.В. Палладина НАН Украины по адресу: 01030, г. Киев, ул. Леонтовича, 9

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биохимии им. А.В.
Палладина НАН Украины по адресу: 01030, г. Киев, ул. Леонтовича, 9

Автореферат разослан «___» декабря 2018 г.

Ученый секретарь специализированного ученого Совета,
кандидат биологических наук

Н.П. Карлова



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Адгезивные межклеточные взаимодействия являются необходимым условием для формирования и поддержания структуры, а также нормального функционирования тканей. Адгезивные белки (АБ) выступают в качестве сигнальных рецепторов, которые связываются с лигандными молекулами на поверхности клеток и обеспечивают передачу сигнала в клетку. Нормальное функционирование организма неразрывно связано с экспонированием определенных АБ на поверхности клеток в соответствии с изменениями, происходящими в организме в течение развития или под действием определенных факторов. Показана роль АБ в процессе формирования синапсов, миграции нейронов, формирования памяти и дифференциации тканей [Ronp L.C.B. et al., 2000]. Экспрессия АБ на поверхности клеток изменяется при онкогенезе и может считаться маркером этого процесса [Farahani E. et al., 2014].

Вместе с тем, остаются невыясненными особенности экспрессии на поверхности мышечных клеток специфических изоформ белка клеточной адгезии N-CAM1, образующихся благодаря альтернативному сплайсингу, их роль в процессе постнатального развития и старения организма. Для нейронального АБ кадгерина семейства CDH2, в отличие от нейрональных белков иммуноглобулинового семейства, остается невыясненной его роль в процессе формирования памяти [Becker C.G., 1996]. Учитывая важную роль компонентов плазминоген-плазминовой системы в развитии практически всех патологических процессов, в генезисе и перестройке тканей, совершенно не раскрыта роль этих компонентов в формировании адгезивных взаимодействий между клетками крови, в частности, между тромбоцитами. Вместе с тем, исследования модулирующей роли плазминогена и его компонентов являются исключительно важными, поскольку они связаны с коррекцией патологического тромбообразования при сердечно-сосудистых заболеваниях, количество которых постоянно растет.

Теоретический аспект проблемы связан с дальнейшим выяснением механизмов адгезивного взаимодействия в тканях млекопитающих и человека. В частности, выявление закономерностей экспонирования и структурных особенностей АБ клеточной поверхности дает представление о формировании адгезивных межклеточных контактов, обеспечивающих функционирование систем организма во время физиологических и патологических изменений.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Представленная диссертационная работа является завершенным исследованием, выполнена автором в соответствии с программой экспериментальных исследований, спланированных, проведенных и обобщенных в течение 1991-2006 гг на кафедре биохимии Днепропетровского университета им. О. Гончара в рамках бюджетных научных тем: №40-94, № ДР 095U014532 «Исследование нейроспецифических белков в норме и при наличии факторов риска с целью разработки методов диагностики

патологических состояний у детей» и №02-20-97, № ДР 0197U000653 «Фундаментальные исследования влияния синергического действия экзопатогенных факторов и научное обоснование новых комплексных методов диагностики, коррекции и профилактики нарушений состояния здоровья населения» Министерства образования Украины. Экспериментальная часть работы в период 2006-2017 гг выполнялась в соответствии с бюджетной научной тематикой отдела химии и биохимии ферментов Института биохимии им.А.В.Палладина НАН Украины в рамках бюджетных научных тем «Структурно-функциональный анализ белков в норме и при некоторых патологиях» (№ ДР 0107U007187, 2007-2011 гг.), «Молекулярные механизмы функционирования ферментов системы гемостаза» (№ ДР 0110U002701, 2010-2012 гг.), «Разработка диагностикумов для тестирования состояния системы разрушения тромбов» (№ ДР 0113U003649, 2013-2015 гг.), «Антиостатины как эндогенные регуляторы функциональной активности клеток» (№ ДР 0112U002624, 2012-2016 гг.), «Механизмы регуляции плазминоген/плазмином межклеточных и межмолекулярных взаимодействий в системе гемостаза в норме и при патологии» (№ ДР 0113U003203, 2013-2017 гг.).

Цель и задачи исследований. Цель работы – раскрыть закономерности экспрессии/экспонирования адгезивных белков и исследовать роль плазминоген/плазминовой системы в формировании адгезивных взаимодействий между тромбоцитами.

Для реализации поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить закономерности экспрессии нейронального белка клеточной адгезии N-CAM1 в скелетных и сердечных мышцах в разные периоды постнатального развития и при старении крыс.
2. Изучить тканеспецифическую экспрессию матричных РНК и полипептидных изоформ белков кадгерина семейства.
3. Выяснить роль нейронального белка клеточной адгезии кадгерина семейства CDH2 в процессе обучения при применении экспериментальной модели.
4. Выяснить модулирующее влияние компонентов плазминоген-плазминовой системы на формирование адгезивных связей между тромбоцитами.

Объект исследования: белки клеточной адгезии и их лиганды.

Предмет исследования: изменения в экспрессии адгезивных белков, принадлежащих к разным классам адгезивных рецепторов и их лигандов при нормальных условиях и при патологии.

Методы исследования. В работе использовались нозерн-блот и вестерн-блот-анализ, иммуноферментный анализ, проточная цитофлуориметрия, электрофорез в ПААГ, модель условного рефлекса пассивного избегания, статистический анализ.

Научная новизна полученных результатов. Впервые показано, что во время постнатального развития скелетных и сердечных мышц экспрессия

мРНК, кодирующих белок N-CAM1, снижается, а при старении – повышается.

Аналогично меняется и количество белка N-CAM1 в тканях скелетных и сердечных мышц. Получены новые данные по экспрессии сплайс-вариантов мРНК белка N-CAM1 с дополнительными экзонами (экзона VASE и специфических экзонов мышц) в скелетных и сердечных мышцах крыс. Таким образом, экспрессия мРНК белка N-CAM1 является отражением компенсаторных механизмов, происходящих в мышечной ткани при старении млекопитающих.

Выявлена специфическая экспрессия мРНК кадгериновых белков в тканях различного генеза (головной мозг, печень, почки, легкие, сердечные и скелетные мышцы). Высокий уровень экспрессии мРНК N-кадгерина (CDH2) показан для всех исследуемых тканей, в то время как экспрессия мРНК CDH1 ограничивается тканями печени, почек и легких, а экспрессия мРНК CDH3 характерна главным образом для тканей почек и легких.

Исследовано влияние ионов кальция на протеолитическую деградацию CDH2. При наличии в среде миллимолярных концентраций ионов кальция происходит деградация цитоплазматического домена CDH2, в то время как при отсутствии кальция имеет место деградация экстрацеллюлярного домена.

Показано, что нейрональный кадгерин и нейрональный белок иммуноглобулинового семейства имеют определенные особенности экспрессии в тканях. Экспрессия белка N-CAM1 меняется в зависимости от периода постнатального развития животного, в то время как для N-кадгеринового белка характерна постоянная экспрессия в тканях постнатального периода и при старении.

Введение антител к белку N-CAM1 в структуры гиппокампа и коры головного мозга крыс приводило к полной потере выработанного навыка, в то время как введение антител к нейронального кадгерину не влияло на процесс обучения.

Впервые показано, что Lys-плазминоген, для которого характерна открытая конформация, оказывает ингибиторное влияние на агрегацию тромбоцитов. Этот эффект реализуется благодаря лизин-связывающим сайтам молекулы и обнаруживает специфичность, поскольку не определяется при адгезивных контактах, обеспечиваемых гликопротеином GP Ib-IX-V и фактором фон Виллебранда.

Предложена модель, которая объясняет повышенное экспонирование адгезивного белка витронектина на тромбоцитарной поверхности при наличии в среде инкубации Lys-плазминогена.

Впервые показано, что Lys-плазминоген через взаимодействие с рецепторами на поверхности тромбоцитов вызывает нарушение реконструкции актиновых микрофиламентов и, как следствие, приводит к уменьшению количества экспонированного Р-селектина на поверхности активированных тромбоцитов.

Практическое значение полученных результатов. Полученные результаты могут быть использованы при разработке оптимальных методов

фармакологической коррекции патологического тромбообразования при сердечно-сосудистых заболеваниях, количество которых постоянно растет. Результаты и выводы работы о роли адгезивных белков в норме и при патологических процессах могут быть использованы при преподавании теоретических курсов «клеточная биология» и «молекулярная биология» в высших учебных заведениях биологического и медицинского профиля.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа является законченным научным исследованием в области биохимии. Соискателем самостоятельно проведен анализ литературных источников по теме диссертации, спланирован и выполнен основной объем экспериментальных исследований. Проведена математическая обработка и статистический анализ полученных результатов. Анализ и обобщение результатов работы, разработка модельных систем с использованием тромбоцитов проведена совместно с н.с., к.б.н. Рока-Мойя Я.М. Фрагменты плазминогена человека (K1-3, K4, K5 и миниплазминоген) получены совместно с н.с., к.б.н. Юсовой Е.И. и н.с., к.б.н. Капустяненко Л.Г., изучение преобразования Glu-плазминогена на Lys-форму на поверхности активированных тромбоцитов – совместно с н.с., к.б.н. Юсовой Е.И., исследования актинового цитоскелета тромбоцитов, экспонирования витронектина, Р-селектина и фосфатидилсерина на поверхности тромбоцитов – совместно с н.с., к.б.н. Тихомировым А.А. и н.с., к.б.н. Рока-Мойя Я.М. Исследование адгезивных белков в сыворотке больных шизофренией проводили совместно с д.б.н. Недзвецким В.С. Иммуногистохимические исследования экспрессии N-кадгерина в ткани поджелудочной железы проведены совместно с д.б.н. Гайдаром Ю.А., исследования роли белков клеточной адгезии иммуноглобулинового и кадгеринового семейства при выработке реакции избегания у крыс были проведены совместно с проф. Нерушем П.А. Исследование экспрессии белков адгезии N-CAM1 и белка CDH2 проводились в Протеин лаборатории Копенгагенского университета под руководством проф. Бок Э.

Все положения и выводы работы сформулированы лично автором диссертации. Основопологающие концепции и выводы работы обсуждались с научным консультантом, д.б.н. Гриненко Т.В.

Апробация результатов диссертации. Основные положения диссертации представлены на международных и отечественных конференциях и конгрессах: European IHPBA Congress "Athens 95" (1995 Афины, Греция), VII Украинский биохимический съезд (Киев, 1997), Международная конференция "Франция и Украина, научно-практический опыт в контексте диалога национальных культур" (Днепропетровск, 1997 и 1998), конференция Украинского общества нейронаук (Донецк, 2001 и Донецк, 2005), Украинский биохимический конгресс (Одесса, 2010 и Киев, 2014), Международная конференция молодых ученых «Биология: от молекулы до биосферы» (Харьков, 2011 и 2012), Международная научная конференция «Молодежь и прогресс биологии» (Львов, 2012 и 2013), Научно-практическая конференция «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки» (Владикавказ, РФ,

2012, 2013 и 2014), Научно-практическая конференция «Aktualne problemy nowoczesnych nauk» (Перемышль, Польша, 2012), Конференция-конкурс молодых ученых «Актуальные проблемы биохимии и биотехнологии» (Киев, 2013 и 2014), 38-й Конгресс FEBS «Mechanisms in Biology» (Санкт-Петербург, РФ, 2013), II Международная конференция «Актуальные проблемы современной биохимии и клеточной биологии» (Днепропетровск, 2013), IX Jakub K. Parnas Conference: Proteins from Birth to Death (Иерусалим, Израиль, 2013), II Междисциплинарная конференция «Адаптационные стратегии живых систем» (Новый Свет, АР Крым, 2014), I Конгресс «БИО 2014» (Варшава, Польша, 2014), Международная конференция «Современные проблемы естествознания в науке и образовательном процессе» (Минск, Беларусь, 2015), Международная конференция Annual Conference «Bridges in Life Sciences» RECOOP HST ASSOCIATION (Вроцлав, Польша, 2014 и 2015, Будапешт, Венгрия, 2016), а также на научном семинаре Института биохимии им. А.В. Палладина НАНУ «Актуальные проблемы современной биохимии» (Киев, 2007 и 2017 гг.).

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 67 печатных работ, в том числе 33 статьи, из которых 22 в научных изданиях Украины, 4 статьи в зарубежных изданиях и 33 тезиса докладов на отечественных и международных конференциях и съездах.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, основной части, включающей обзор литературы, экспериментальную часть (2 главы) и заключения, списка использованных литературных источников (498 наименований). Работа изложена на 319 страницах печатного текста, проиллюстрирована 75 рисунками, содержит 5 таблиц.

Перечень условных сокращений. N-CAM1 – neural cell adhesion molecule, нейрональная молекула клеточной адгезии; VASE – variable-domain alternatively spliced exon, вариативный домен, который образуется благодаря альтернативному сплайсингу; PMSF – фенилметилсульфонил фторид; vWF – фактор фон Виллебранда; ADP – аденозиндифосфат; GP – гликопротеин; PLC – фосфолипаза C; G-актин – глобулярный актин; F-актин – филаментный актин; MC-актин – актин мембранного кортекса; K1-K5 крингловые домены плазминогена 1-5; LBS – лизин-связывающие сайты; tPA – тканевой активатор плазминогена; 6-AGK – 6-аминогексановая кислота; БТП – безтромбоцитарная плазма; ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма; T540 nm – светопропускание при $\lambda = 540$ нм; ЭДТА – этилендиаминотетраацетат; S 2251 (H-D-Val-L-Leu-L-Lys-p-нитроанилид дигидрохлорид) – хромогенный субстрат плазмينا; АБ – адгезивные белки; ПААГ – полиакриламидный гель; SDS – додецилсульфат натрия; FITC – фенилизотиоцианат.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение.

Во введении отражена научная проблема, обоснована актуальность темы работы, сформулированы цели и задачи исследования, определены научная новизна и практическая значимость результатов, даны общие сведения об объеме диссертации.

Обзор литературы.

В обзоре литературы систематизированы современные данные о структурно-функциональных особенностях основных классов молекул клеточной адгезии, а именно – представителей иммуноглобулинового семейства, кадгеринов, селектинов и интегринов. Показана модулирующая роль плазминоген/плазмينا во взаимодействиях клетка-клетка и клетка-матрикс.

Материалы и методы исследований.

Олигонуклеотиды (нуклеотидные последовательности из 30-40 нуклеотидов), специфичные для различных матричных РНК белков N-CAM1, синтезированы на основе известных последовательностей клонов кДНК белка N-CAM1 [Small S.J., 1987]. Соответствие проб олигонуклеотидным последовательностям определенных экзонов описана в работе [Andersson A-M, 1993]. Пробы N-cad I и N-cad II синтезированы на основе последовательности, кодирующей регион белка CDH2, который отделяется от зрелого полипептида. Проба N-cad II имела наименьшую гомологию с E-кадгерином (44%) и P-кадгерином. Олигонуклеотиды E-cad I и E-cad II синтезированы на основе кДНК E-кадгерина мыши [Nagafuchi A., 1987]. Эти пробы отвечали последовательностям, кодирующим экстрацеллюлярный и цитоплазматический домены соответственно. Олигонуклеотиды, синтезированные на основе кДНК P-кадгерина мыши P-cad I и P-cad II [Nose A., 1987], отвечали последовательностям, кодирующим экстрацеллюлярный и цитоплазматический домены соответственно. Процент гомологии между олигонуклеотидными пробами N-кадгерина и кДНК последовательностями E- и P-кадгерина определяли так, как рекомендовано в работе [Devereux J., 1984].

Нозерн-блот анализ проведен как описано в работе [Andersson A-M, 1993]. Препарат матричных РНК получали фенол-хлороформным методом, за основу взята методика [Gozes I, 1984]. Электрофоретическое разделение мРНК, прегрибридизацию и гибриридизацию проводили согласно методики, описанной в работе [Andersson A-M, 1993]. Моноклональные мышиные антитела OB11, специфичные к цитоплазматическому эпитопу изоторм N-CAM1, были любезно предоставлены доктором Натту Langbeheim, Израиль. Все другие антитела, используемые в исследованиях с белком N-CAM1, были получены от фирмы Dakopatts, США. Получение поликлональных антител к белку CDH2 anti-N-cad-cyt детально описано в работе Linnemann D, 1994. Поликлональные антитела к белку CDH2 R-156 были любезно предоставлены доктором Benjamin Geiger, Институт Вейсмана, Израиль.

Вестерн-блот анализ белков клеточной адгезии проводили по методикам, подробно описанным в работах [Linnemann D, 1994; Andersson A-M, 1993;

Gaardsvoll, 1993]. При инкубации с антителами OB11 проводили доочистку препарата N-CAM1 до проведения электрофореза, как описано в работе [Andersson A-M, 1993]. Для получения препарата белка N-CAM1 из сердечной мышцы использовали методику, описанную в работе [Gaardsvoll H., 1993]. Препарат эндосиалидазы N был любезно предоставлен доктором Jurgen Roth, Цюрихский университет, Швейцария. Количество белка N-CAM1 определяли методом иммуноферментного анализа, как описано в работе [Ibsen S., 1983]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-теста Стьюдента, различия между средними значениями в разных группах считали достоверными при $P < 0,05$. Для проведения иммуноблоттинга при определении кадгеринов и определении эффектов кальция на стабильность N-кадгеринового полипептида использовали методику, описанную в работе [Linnemann D., 1994]. Эффекты кальция на стабильность N-кадгеринового полипептида исследовали с помощью иммуноблоттинга, используя поликлональные антитела anti-N-cad-сут. или поликлональные антитела R-156. Для проведения иммуногистохимического исследования экспрессии белка CDH2 во время эмбрионального развития поджелудочной железы использовали поджелудочную железу человека из абортного материала (Днепропетровская областная больница). Сбор материала проводился согласно Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы медицинских исследований с участием человека в качестве объекта исследований», 1996 г.

При проведении исследований, касающихся модулирующего влияния плазминогена на агрегационную способность тромбоцитов, использовали кровь условно здоровых доноров из военного клинического госпиталя Министерства обороны Украины. Кровь была предоставлена ЗПП «Хутровик» (г. Узин, Украина). Glu-плазминоген человека получали из цитратной плазмы крови человека методом аффинной хроматографии на лизин-сефарозе 4B [Deutsch, 1970]. Lys-плазминоген человека получали по аналогичной методике из фракции $\Pi_{2,3}$ плазмы крови по Кону. Плазмин получали по методике [Norman, 1985]. Фрагменты плазминогена кринглы 1-3 (K1-3), крингл 4 (K4), крингл 5 (K5) и миниплазминоген получали, как описано в работе [Roka-Moya YM et al., 2014]. Для идентификации Glu- и Lys-форм плазминогена применяли электрофорез в ПААГ [Panium, 1969]. Активность плазмينا и потенциальную активность плазминогена определяли по скорости высвобождения *п*-нитроанилина из хромогенного субстрата S2251. Образцы ОТП получали как описано в работе [Рока-Мойа, 2012]. Агрегацию тромбоцитов исследовали в препаратах ОТП крови и в суспензии отмытых тромбоцитов человека на оптическом агрегометре «SOLAR AT-02» (Беларусь) по протоколу [Зубовская, 2010]. Анализ данных агрегометрии проводили с использованием пакета программ «Агрегометр 2.01», степень и скорость агрегации регистрировались автоматически. Степень агрегации (Tmax) определяли, как максимальное значение светопропускания ($T, \lambda = 540 \text{ нм}$) реакционной смеси, которое достигается через 5 мин после добавления индуктора агрегации. Перед

внесением агониста агрегации образцы прединкубировали с Glu-, Lys-плазминогеном, плазмином, фрагментами плазминогена (K1-3, K4, K5, миниплазминоген) в течение 3 мин для их взаимодействия с клеточной поверхностью.

Белковые фракции тромбоцитов, содержащие различные пулы актина, получали после разрушения клеток с помощью детергентсодержащего буфера и последующего дифференциального центрифугирования, как описано в работе [Díaz-Ricart, 2000]. Детекцию пулов актина в составе белковых фракций тромбоцитов проводили методом иммуноблоттинга в соответствии с общепринятой методикой [Towbin, 1979]. Относительное содержание различных пулов актина в тромбоцитах оценивали денситометрически с использованием программы «Total Lab - 120» (США) и выражали в процентах от количества фибриллярного актина в исследуемой группе клеток.

Для оценки влияния различных форм плазминогена на экспонирование витронектина тромбоцитами был использован метод проточной цитофлуориметрии с использованием антител к витронектину и вторичных FITC-конъюгированных антител (SigmaAldrich, США). Подробно методика изложена в работе [Zhernoshekov D.D. et al. 2015]. Для проведения исследования были использованы следующие группы клеток: интактные тромбоциты (контроль); тромбоциты, инкубированные с Glu- или Lys-плазминогеном; тромбоциты, обработанные тромбином, и тромбоциты, обработанные тромбином после их предварительной инкубации с Lys-плазминогеном. Детекция была проведена по каналу FL1 (515-535 нм). Количественные изменения флуоресценции были выражены в условных единицах (у.е.), которые представляли собой десятичный логарифм величин по шкале Log FL1. Для получения статистически достоверных результатов было проанализировано не менее 10 000 событий в каждом образце. Графическое изображение результатов получали с помощью программы FCS Express V3 (De Novo Software, США).

Для исследования влияния различных форм плазминогена на экспонирование Р-селектина использовали отмытые тромбоциты человека и антитела к Р-селектину, конъюгированные с фикоэритрином. Группы клеток, использованные для экспериментов, аналогичны тем, которые использовали при исследовании с витронектином. Детекция была проведена по каналу FL3 (620-630 нм). Графическое изображение результатов получали с помощью программы FCS Express V3 («De Novo Software», США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия *t* Стьюдента, различия между средними значениями в разных группах считали достоверными при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия нейронального белка клеточной адгезии N-CAM1 в скелетных и сердечных мышцах во время постнатального развития и старения крыс. Особенности экспрессии белков клеточной адгезии иммуноглобулинового семейства рассмотрены на примере белка N-CAM1. В мышцах взрослых млекопитающих N-CAM1 сконцентрирован в регионе нервно-мышечных соединений и сателлитных клеток [Cashman N.R., 1987]. Нами проведено исследование экспрессии сплайс-вариантов мРНК белка N-CAM1 с определенными экзонами в скелетных и сердечных мышцах во время постнатального развития и старения крыс, а также определены полипептидные изоформы этого белка в мышечной ткани. Экспрессию мРНК белка N-CAM1 в скелетных мышцах во время постнатального развития и старения крыс определяли с помощью нозерн-блоттинга и соответствующих олигонуклеотидных проб. Синтезированные пробы узнают соответствующие экзоны и комбинации экзонов в составе мРНК. Три типа мРНК N-CAM1 (6,7; 5,2 и 2,9 кб) гибридизуются с пробой E7 в скелетных мышцах крысы (рис. 1). В препаратах скелетных мышц крысы в период раннего постнатального развития (первый и десятый день) определяются все три типа мРНК N-CAM1 в примерно одинаковых количествах (треки 2 и 3). В препаратах скелетных мышц взрослых животных общее количество мРНК N-CAM1 снижено и мРНК N-CAM1 размером 5,2 и 2,9 кб более выражены чем мРНК размером 6,7 кб (трек 4). В скелетных мышцах девятимесячных крыс мРНК белка N-CAM очень слабо выражены, в то время как на 730-й день в тех же мышцах более значительно выражена экспрессия мРНК размером 5,2 и 2,9 кб (треки 5 и 6).

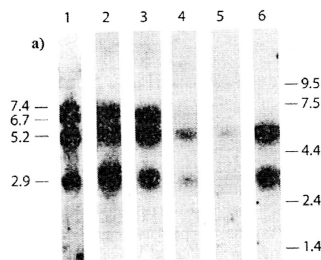


Рис. 1. Экспрессия мРНК белка N-CAM1 в скелетных мышцах крысы во время нормального развития и при старении животных (E7). Нозерн-блоттинг: 1 – препарат головного мозга взрослой крысы, 2-6 – препараты скелетных мышц: 2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 270-й день, 6 – 730-й день.

Таким образом, во время старения крыс в мышцах происходят изменения не только в количестве мРНК N-CAM1, но меняется и экспрессия определенных мРНК этого белка. Альтернативный сплайсинг экзонов 7/8 и экзона VASE в мРНК белка N-CAM1 скелетных мышц изучали с помощью проб E 7/8 и E VASE. Проба E 7/8 гибридизуется с мРНК N-CAM1, которая не имеет последовательности альтернативно сплайсированного экзона VASE. Как видно из данных нозерн-блоттинга (рис. 2), в скелетных мышцах большинство мРНК белка N-CAM1 не имеют в своем составе последовательности VASE. Только слабая экспрессия этого сплайс-варианта наблюдается в препаратах скелетных мышц на 1-й день постнатального развития и в мышцах старых животных. Гибридизация с этим экзонном характерна для мРНК N-CAM1 размером 5,2 и 2,9 кб. По сравнению с экспрессией сплайс-варианта с экзонном VASE в головном мозге крысы, экспрессию этого сплайс-варианта в скелетных мышцах можно считать незначительной.

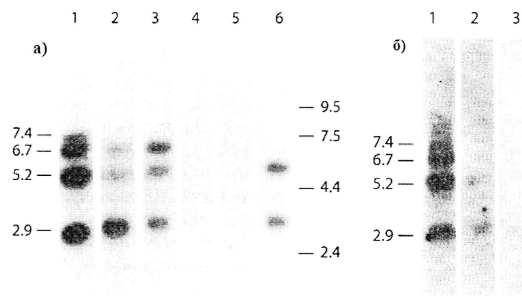


Рис. 2. Экспрессия мРНК белка N-CAM1 в скелетных мышцах крысы на различных сроках постнатального развития животных (гибридизация с пробами E7/8 и EVASE). Нозерн-блоттинг: а – проба E7/8: 1 – препарат головного мозга взрослых крыс, 2-6 – препараты скелетных мышц: 2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 270-й день, 6 – 730-й день; б – проба EVASE: 1 – препарат головного мозга взрослых крыс, 2 – препарат скелетных мышц, полученный в 1-й день постнатального развития крысы, 3 – 730-й день постнатального развития.

Данные, касающиеся альтернативного сплайсинга между 12 и 13 экзонами, представлены на рис. 3. Матричные РНК белка N-CAM1, которые не подвергались альтернативному сплайсингу между 12-м и 13-м экзонами, принадлежали к мРНК размером 6,7 кб. Пробы, соответствующие альтернативно сплайсированным дополнительным экзонам, гибридизуются главным образом с мРНК N-CAM1 размером 5,2 и 2,9 кб. Гибридизация с

пробой E12/a/AAG/13 обнаруживает экспрессию сплайс-варианта с комбинацией экзонов 12-а-AAG-13 в постнатальных скелетных мышцах (рис. 3, б). Эта экзонная комбинация присутствует в мРНК N-CAM1, которые обеспечивают синтез изоформ, прикрепляемых к мембране благодаря фосфатидилинозитоловому якорю. Можно отметить, что экспрессия мРНК белка N-CAM1 в скелетных мышцах характеризуется определенными изменениями во время постнатального развития и при старении животных.

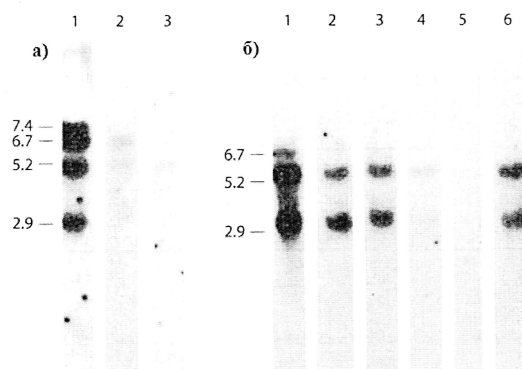


Рис. 3. Экспрессия мРНК белка N-CAM1 в скелетных мышцах крыс на различных сроках постнатального развития животных (гибридизация с пробойми E12/13, E12/a/AAG/13). Нозерн-блоттинг: а – проба E12/13: препарат головного мозга взрослых крыс, 2 – 10-й день, 3 – 730-й день; б – проба E12/a/AAG/13: 1 – препарат головного мозга взрослых крыс, 2-6 – препараты скелетных мышц крыс на различных сроках постнатального развития животных: 2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 270-й день, 6 – 730-й день.

Матричные РНК N-CAM1 размером 6,7, 5,2 и 2,9 кб четко выражены в скелетных мышцах в период раннего постнатального развития, но в препаратах мышц взрослых животных их экспрессия снижена. В мышцах старых крыс наблюдается резэкспрессия мРНК N-CAM1 размером 5,2 и 2,9 кб, экспрессия мРНК 6,7 кб остается на невысоком уровне. Экзон VASE, который имеет выраженность в мРНК N-CAM1 при постнатальном развитии головного мозга крысы [Small, 1990], в препаратах мРНК скелетных мышц почти не проявляется. Следует отметить, что в тканях с высоким уровнем регенерации изоформы N-CAM1 являются VASE-отрицательными [Saffell J.L., 1994].

Определение изоформ белка N-CAM1 в скелетных мышцах проводили с

использованием поликлональных антител, которые узнавали все изоформы этого белка. Результаты исследования приведены на рис. 4. Гомогенаты скелетных мышц содержат значительное количество миозина, который мешает электрофоретическому разделению целевых белков и даст неспецифическую реакцию связывания с антителами. Чтобы избежать этого, нами для экспериментов была использована фракция супернатанта, полученного при высоких оборотах (100 000 g, 1,5 часа) и тритоновый солюбилизиат. В тритоновом солюбилизиате скелетных мышц определяются четыре изоформы N-CAM1 с молекулярными массами 200, 145, 125 и 120 кДа. Изоформа N-CAM1-145 является доминирующей во всех препаратах независимо от возраста животного (рис. 4, треки 4-8). Следует отметить, что выраженность полипептидных зон меняется в зависимости от возраста: четкая экспрессия в период раннего постнатального развития мышц, далее – минимальная выраженность в препаратах мышц взрослой крысы (треки 3 и 6), и резэкспрессия белка N-CAM1 в препаратах мышц старых животных (треки 6-8).

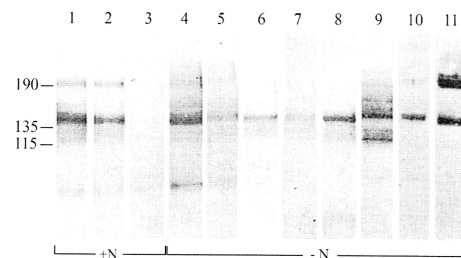


Рис. 4. Результаты иммуноблоттинга изоформ белка N-CAM1, в препаратах скелетных мышц крысы во время развития и старения. Образцы в треках 1-3 были обработаны этилсалицидолом N (+ N), в треках 4-11 обработки не было (-N). Препараты мембран скелетных мышц на первый день постнатального развития (треки 1 и 4), на 10-й день – треки 2 и 5, на 40-й день – треки 3 и 6, на 270-й день – трек 7, на 730-й день – трек 8. Супернатант из скелетных мышц крыс первого дня постнатального развития – трек 9, очищенный препарат белка N-CAM1 из скелетных мышц крыс первого дня постнатального развития – трек 10, препарат мембранной фракции головного мозга крысы на 40-й день постнатального развития – трек 11. Треки 1-9 были проинкубированы с поликлональными антителами против белка N-CAM1, треки 10-11 были проинкубированы с моноклональными антителами против белка N-CAM1, OB11, реагирующими с эпитопами цитоплазматического домена белка. Треки 1-5 из одного геля, 7-9 и 10-11 – из других, электрофорез был проведен при одинаковых условиях. Общее количество белка в треках составляло 13 мкг (трек 1-5, 7 и 8), 60 мкг в треке 6 и 110 мкг в треке 9. Молекулярные массы изоформ белка N-CAM1 из головного мозга взрослой крысы (Р 40) обозначены слева.

В препаратах мышц на ранних стадиях постнатального развития наблюдается диффузное окрашивание вблизи полипептидных зон 200 и 145 кДа и выше области 120-125 кДа. Такое явление может быть вызвано присутствием полисиалированных полипептидов N-CAM1. Для удаления остатков сиаловой кислоты пробы обрабатывали эндосиалидазой N (треки 1-3). В препаратах мышц старых животных диффузное окрашивание отсутствует, что указывает на то, что в скелетных мышцах взрослых и старых животных изоформы N-CAM1 или имеют минорное полисиалирование, или лишены его вообще. Согласно полученным данным, изоформа N-CAM1-145 является более выраженной в скелетных мышцах старых животных, чем в мышцах взрослой крысы. Однако, обнаруженный эффект не сопровождается повышенной экспрессией мРНК размером 6,7 кб. Это может быть объяснено двумя причинами: либо в мышцах старых животных снижен катаболизм изоформы N-CAM1-145, либо, наоборот, транскрипционная скорость мРНК размером 6,7 кб повышена по сравнению с мРНК размером 5,2 и 2,9 кб. Трансмембранные изоформы N-CAM1 скелетных мышц определяли с помощью моноклональных антител ОВ11, которые реагировали с цитоплазматическим эпитопом, который был общим для трансмембранных изоформ N-CAM1-190 и N-CAM1-135 из головного мозга крысы (рис. 4, трек 11). Как свидетельствуют приведенные данные, в скелетных мышцах крысы изоформы N-CAM1 с молекулярными массами 200 и 145 кДа имеют в своем составе цитоплазматический эпитоп. Определение количества белка N-CAM1 в препаратах скелетных мышц проводили с использованием иммуоферментного анализа (рис. 5).

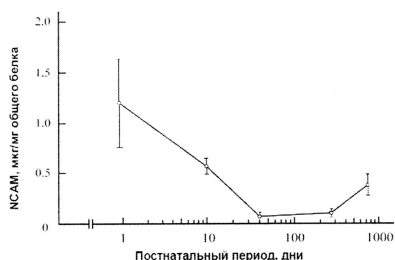


Рис. 5. Количество белка N-CAM1 в скелетных мышцах крысы в разные периоды постнатального развития. Результаты иммуоферментного анализа выражены в мкг белка N-CAM1/мг общего белка.

Как свидетельствуют приведенные данные, количество белка N-CAM1 снижается в течение постнатального развития мышц, достигая минимального

значения в препаратах скелетных мышц взрослых крыс. На первый день постнатального развития крысы количество белка N-CAM1 в скелетных мышцах составляло $1,21 \pm 0,44$ мкг/мг общего белка, на сороковой день — $0,063 \pm 0,008$ мкг/мг общего белка. В мышцах старых крыс количество белка N-CAM1 была повышено и составляло $0,37 \pm 0,011$ мкг/мг общего белка на 730 день постнатального развития животных. Считают, что денервированные мышцы и мышцы старых животных характеризуются сходными изменениями относительно свойств миофибрилл. Во время старения мышц наблюдают потерю целых моторных единиц и неполную реиннервацию денервированных мышечных фибрилл моторными нейронами, которые остались. Считают, что у старых крыс имеет место нарушение аксональной регенерации. Повышенный уровень белка N-CAM1 в скелетных мышцах старых животных, который мы наблюдаем, полностью соответствует такому объяснению.

Особенности экспрессии мРНК N-CAM1 в сердечных мышцах определяли с пробами, которые были использованы для анализа скелетных мышц. Как видно из рис. 6, проба Е7 гибридизуется с тремя типами мРНК N-CAM1 в сердечных мышцах — 6,7; 5,2 и 2,9 кб.

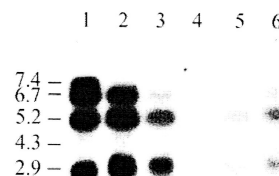


Рис. 6. Экспрессия мРНК белка N-CAM1 в сердечных мышцах крысы во время нормального развития и при старении животных (Е7). Нозерн-блоттинг: 1 — препарат головного мозга взрослой крысы, 2-6 — препараты сердечных мышц: 2 — 1-й день, 3 — 10-й день, 4 — 40-й день, 5 — 270-й день, 6 — 730-й день.

В некоторых треках наблюдается очень слабая экспрессия мРНК размером 4,3 кб. В первый день постнатального развития все три типа мРНК белка N-CAM1 присутствуют в примерно одинаковом количестве (трек 2). В дальнейшем, во время постнатального развития и старения мышц, мРНК N-CAM1 размером 5,2 и 2,9 кб более выражены по сравнению с мРНК размером 6,7 кб (треки 3-6).

Общее количество мРНК, кодирующих белок N-CAM1, снижается во время постнатального развития, достигая минимального значения в сердечных мышцах взрослых животных на 40-й день постнатального развития.

В сердечных мышцах старых крыс, как и в случае скелетных мышц, наблюдается реэкспрессия мРНК белка N-CAM1, причем, эта реэкспрессия характерна для всех типов мРНК. В отличие от скелетных мышц, в сердечных мышцах наблюдается выраженная гибридизация EVASE с соответствующими матричными РНК белка N-CAM1, а именно – с мРНК размером 6,7; 5,2 и 2,9 кб (рис. 7).

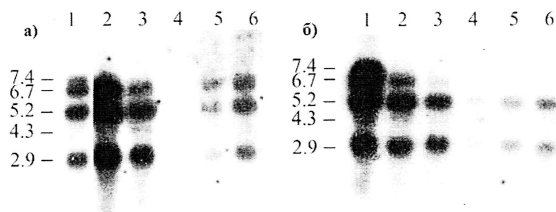


Рис. 7. Экспрессия мРНК белка N-CAM1 в сердечных мышцах крысы во время постнатального развития и старения животных (гибридизация с пробами E7/8 и EVASE). а – проба E7/8, которая гибридизуется с мРНК препаратов головного мозга взрослой крысы (1) и сердечных мышц в разные периоды постнатального развития крыс (2-6): 2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 270-й день, 6 – 730-й день; б – проба EVASE, которая узнает мРНК, содержащие в своем составе альтернативно экспрессируемый экзон VASE. 1 – препарат головного мозга взрослой крысы, 2-6 – препараты сердечных мышц крыс в разные периоды постнатального развития: 2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 270-й день, 6 – 730-й день. Все треки содержали одинаковое количество мРНК. Размеры мРНК указаны слева.

Количество мРНК размером 6,7 кб с экзоном VASE снижается во время постнатального развития сердечных мышц, в то время как количество мРНК размером 5,2 и 2,9 кб сохраняется на достаточно высоком уровне и при постнатальном развитии, и при старении. Для исследования экспрессии сплайс-вариантов с мышечно-специфическими экзонами в препаратах сердечной мышцы были использованы пробы E12/13 и E12/a/AAG/13. Как видно из приведенных данных (рис. 8), проба E12/13 узнает три типа мРНК N-CAM1 (6,7, 5,2 и 2,9 кб) в препаратах сердечной мышцы как при постнатальном развитии, так и при старении. Следует отметить, что экспрессия сплайс-вариантов мРНК размером 6,7 кб с дополнительными мышечно-специфическими экзонами снижается во время постнатального развития, а для сплайс-вариантов мРНК размером 5,2 и 2,9 кб таких выраженных изменений не зарегистрировано (рис. 8, б). Анализируя полученные данные, можно сказать, что в скелетных и сердечных мышцах, в отличие от головного мозга,

практически не определяется класс мРНК N-CAM1 размером 7,4 кб. Однако, соответствующая изоформа белка N-CAM1 определяется методом иммуноблоттинга. Вероятно, что мРНК размером 7,4 кб находится в таком небольшом количестве в скелетных и сердечных мышцах, что не регистрируется методом нозерн-блоттинга. Экспрессия сплайс-варианта мРНК экзона VASE была наиболее выражена в сердечных мышцах раннего постнатального периода. Нами показано, что экспрессия сплайс-вариантов мРНК N-CAM1 размером 5,2 и 2,9 кб с дополнительными экзонами а и AAG более выражена, чем для варианта мРНК размером 6,7 кб. Наличие экзона а в сплайс-вариантах мРНК обеспечивает появление изоформы белка с дополнительной последовательностью пролиновых остатков, что влияет на адгезивные свойства белка N-CAM1.

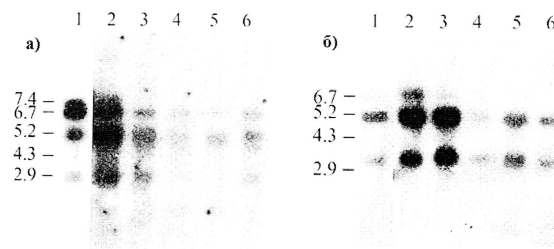


Рис. 8. Экспрессия мРНК белка N-CAM1 в сердечных мышцах крысы во время постнатального развития и старения крыс (гибридизация с пробами E12/13 и E12/a/AAG/13). а – проба E12/13, которая гибридизуется с мРНК препаратов головного мозга взрослых крыс (1) и сердечных мышц крыс в разные периоды постнатального развития (2-6): 2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 270-й день, 6 – 730-й день; б – проба E12/a/AAG/13, которая узнает последовательности мРНК, содержащие в своем составе альтернативно экспрессируемый экзон 12/a/AAG/13. 1 – препарат головного мозга взрослой крысы, 2-6 – препараты сердечной мышцы крысы в разные периоды постнатального развития: 2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 270-й день, 6 – 730-й день. Все треки содержали одинаковое количество мРНК. Размеры мРНК указаны слева.

Результаты исследования молекулярных изоформ белка N-CAM1 в сердечных мышцах крысы приведены на рис. 9. В препаратах сердечных мышц, полученных на различных стадиях постнатального развития, наблюдаются три основные изоформы с молекулярными массами 190, 145 и 120 кДа. Причем, изоформа N-CAM1-145 имеет лучшую выраженность (треки 2-6). В некоторых пробах наблюдается изоформа с молекулярной массой 165 кДа.

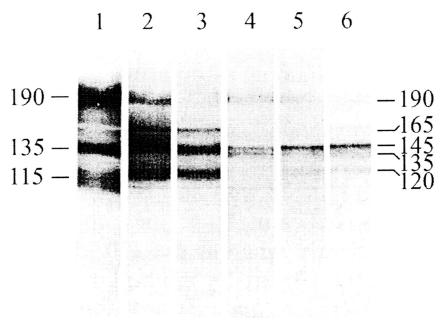


Рис. 9. Результаты иммуноблоттинга изоформ белка N-CAM1, наблюдаемых в препаратах сердечных мышц во время развития и старения крыс. 1 – препарат мембранной фракции головного мозга крысы на 40-й день постнатального развития, 2-6 – препараты сердечных мышц крыс в разные периоды постнатального развития: 2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 270-й день, 6 – 730-й день. Блот был проинкубирован с поликлональными антителами против белка N-CAM1. Молекулярные массы изоформ белка N-CAM1 из головного мозга взрослых крыс обозначены слева, а молекулярные массы изоформ этого белка, наблюдаемые в препаратах сердечных мышц, – справа.

Определение количества белка N-CAM1 в препаратах сердечных мышц проводили с использованием иммуноферментного анализа (рис. 10). Согласно приведенным данным, количество белка N-CAM1 снижается в течение постнатального развития мышц, достигая минимального значения в препаратах скелетных мышц взрослых крыс. На первый день постнатального развития крысы количество белка N-CAM1 в скелетных мышцах составляет $0,93 \pm 0,14$ мкг/мг общего белка, на сороковой день – $0,21 \pm 0,01$ мкг/мг общего белка. В мышцах старых крыс количество белка N-CAM1 повышено и составляет $0,34 \pm 0,05$ мкг/мг общего белка на 730 день постнатального развития животных. Полученные результаты по экспрессии N-CAM1 в сердечных мышцах указывают на высокий уровень экспрессии этого белка в период раннего постнатального развития, минимальный уровень в период взрослого состояния животного и повышенное содержание при старении.

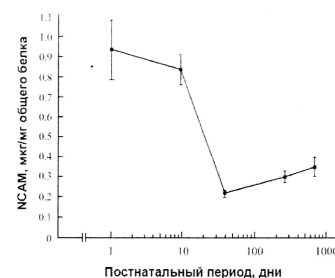


Рис. 10. Количество белка N-CAM1 в препаратах сердечных мышц в разные периоды постнатального развития крыс. Результаты иммуноферментного анализа выражены в мкг белка N-CAM1/мг общего белка.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют, что белок N-CAM1 вовлечен в компенсаторные механизмы, имеющие место в мышечной ткани при старении животных.

Тканеспецифическая экспрессия мРНК и полипептидных изоформ нейронального белка кадгеринового семейства. Рассматривая экспрессию АБ кадгеринового семейства, мы обнаружили ряд отличий от адгезивных молекул иммуноглобулинового семейства. Проведенный анализ экспрессии мРНК полипептида CDH2 во время развития и старения тканей печени, скелетных и сердечных мышц, почек и легких с пробой N-cad II не выявил значительных различий (качественных или количественных) в экспрессии мРНК этого белка. Вместе с тем, нами выявлено, что экспрессия близкородственных кадгеринов (N-, E- и P-) в головном мозге, мышцах, легких, почках и печени обеспечивается специфическим набором матричных РНК. Типичные результаты нозерн-блоттинга с соответствующими пробами представлены на рис. 11. Как свидетельствуют результаты экспериментов, экспрессия белка CDH2 в головном мозге и скелетных мышцах крысы связана с мРНК размером 5,2 и 4,4-4,3 кб (рис. 11, а, треки 1 и 3). Для ткани печени характерны матричные РНК 4,4-4,3 кб и 3,5 кб (рис. 11, а, трек 2). В сердечных мышцах, почках и легких наблюдаются все три типа матричных РНК CDH2 (рис. 11, а, треки 4-6). Поскольку для эксперимента было взято примерно одинаковое количество препаратов матричных РНК, то можно утверждать, что наибольший уровень экспрессии белка CDH2 характерен для ткани головного мозга, печени и сердечных мышц.

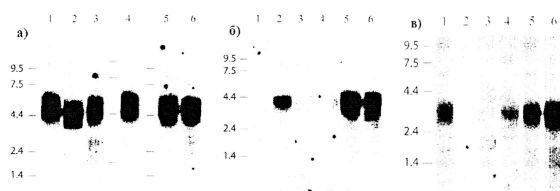


Рис. 11. Нозерн-блоттинг препаратов мРНК тканей крыс (4-10 сутки постнатального развития) с использованием проб N-cad II (а), E-cad I (б) и P-cad I (в). 1 – препарат из головного мозга, 2 – препарат печени, 3 – препарат скелетных мышц, 4 – препарат сердечных мышц, 5 – препарат почечной ткани, 6 – препарат ткани легких. В (а) представлены треки 5 и 6, полученные после длительной экспозиции. Слева обозначены размеры матричных РНК.

Матричные РНК Е-кадгерина (4,3 кб) обнаружены в печени, почках и легких, но их не было в головном мозге, скелетных и сердечных мышцах (рис.11, б). Матричные РНК Р-кадгерина (CDH3) размером 3,5 кб наблюдались в тканях почек и легких, слабая экспрессия этих РНК характерна для головного мозга и сердечной мышцы (рис. 11, в, треки 1 и 4). В тканях печени и в скелетных мышцах экспрессия Р-кадгериновых матричных РНК не обнаружена (рис. 11, в, треки 2 и 3).

Для анализа экспонирования N-кадгеринового полипептида в различных тканях крысы были использованы две разновидности антител – поликлональные антитела R-156, направленные против последовательности из 24 С-концевых аминокислот белка CDH2 цыпленка и поликлональные антитела N-cad-cyt, произведенные против полной последовательности белка CDH2 цыпленка. Первые антитела реагировали с широким спектром кадгеринов, включая Е- и Р-кадгерин [Geiger B., 1990]. Результаты иммуноблоттинга представлены на рис. 12. По результатам иммуноблоттинга с антителами анти-N-cad-cyt в препаратах головного мозга, скелетных и сердечных мышц, почек и печени наблюдаются четкие полипептидные зоны, соответствующие молекулярной массе белка CDH2. В препаратах печени, скелетных и сердечных мышц и легких наблюдается полипептид с молекулярной массой 133 кДа, а в головном мозге и почках основная форма белка CDH2 представлена полипептидом с молекулярной массой 130 кДа. В головном мозге также обнаружены дополнительная полипептидная зона с молекулярной массой 122 кДа и слабая зона, соответствующая белку с молекулярной массой 110 кДа.

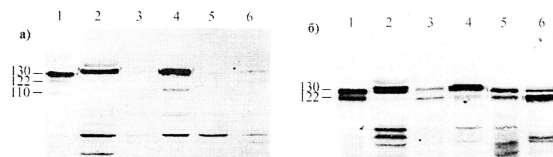


Рис. 12. Результаты иммуноблоттинга с антителами анти-N-cad-cyt (а) и R-156 (б). 1 – головной мозг, 2 – печень, 3 – скелетные мышцы, 4 – сердечные мышцы, 5 – почки, 6 – легкие. Молекулярные массы обозначены справа. Крысы в возрасте 4-х дней после рождения.

Полипептид с молекулярной массой 122 кДа узнается как антителами анти-N-cad-cyt, так и антителами R-156. Этот полипептид может быть следствием действия протеиназы, которая отделяет фрагмент экстрацеллюлярного N-концевого домена от полипептида с молекулярной массой 130 кДа, или это другой кадгерин, имеющий высокую степень гомологии с N-кадгерином. Поскольку нет корреляции между протеолитической деградацией белка CDH2 с молекулярной массой 130 кДа и появлением фрагмента с молекулярной массой 122 кДа, то первый вариант маловероятен. Выявление полипептида с молекулярной массой 122 кДа с помощью антител R-156 дает возможность утверждать, что у этого кадгерина высокая гомология последовательности С-концевой части цитоплазматического домена с такой же последовательностью в молекуле белка CDH2. Вполне вероятно, что это R-кадгерин, у которого С-концевая последовательность цитоплазматического домена отличается от С-концевой последовательности белка CDH2 только тремя аминокислотами. Молекулярная масса R-кадгерина составляет около 122 кДа [Inuzuka H., 1991]. Наличие полипептида с молекулярной массой 110 кДа можно объяснить действием кальпаиновой протеазы, которая расщепляет N-кадгерин с образованием полипептида с молекулярной массой 110 кДа. Считают, что эта протеаза нарушает связь цитоскелетных белков с кадгеринами, что приводит к потере последними адгезивных свойств [Konze S.A., 2014].

Протеолитическая деградация N-кадгеринового полипептида. Нами был также исследован эффект ионов кальция на протеолитическую деградацию полипептида CDH2 с использованием поликлональных антител anti-N-cad-cyt и поликлональных антител R-156. При подготовке препаратов использовали два подхода: кальций вносили или в буфер для гомогенизации, или в буфер для солибутизации. Результаты экспериментов не отличались при использовании различных подходов. Типичные результаты эксперимента представлены на рис. 13. В присутствии 10 мМ ЭДТА четыре полипептидные зоны с молекулярными массами 130, 122, 95 и 85 кДа были определены с использованием двух видов антител, треки 1 и 3. Это свидетельствует о том, что полипептиды имеют все

или почти все аминокислотные остатки С-концевой последовательности полипептида CDH2. В присутствии 10 мМ хлорида кальция поликлональные антитела anti-N-cad-сут узнавали полипептидную зону с молекулярной массой 110 кДа и давали слабую реакцию с полипептидом, молекулярная масса которого была 122 кДа. Полипептиды с молекулярными массами 130, 95 и 85 кДа с помощью этих антител не определялись (трек 2). Другая картина наблюдалась при использовании антител R-156. Они не узнавали полипептид с молекулярной массой 110 кДа, а давали только реакцию с полипептидом, молекулярная масса которого была 122 кДа. В присутствии 10 мМ хлорида кальция полипептиды с молекулярными массами 130, 95 и 85 кДа антителами R-156 не определялись (трек 4). Как отмечалось ранее, полипептид с молекулярной массой 122 кДа может быть близкородственным кадгерином, например R-кадгерином, который имеет высокую гомологию с С-концевой последовательностью полипептида CDH2. Полученные данные позволяют предположить, что в условиях эксперимента, когда в среде концентрация ионов кальция составляла 10 мМ, деградация N-кадгеринового полипептида происходит благодаря действию m-кальпаинового фермента, который, в отличие от μ -кальпаина, активируется миллимолярными концентрациями хлорида кальция. В этом случае имеет место деградация экстрацеллюлярного домена CDH2, о чем свидетельствует появление полипептидной зоны с молекулярной массой 110 кДа. При отсутствии кальция имеет место деградация экстрацеллюлярного домена, поскольку полипептиды молекулярными массами 130, 122, 95 и 85 кДа узнавались обоими типами антител.

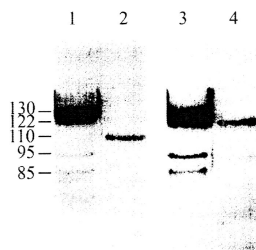


Рис. 13. Влияние ионов кальция на стабильность N-кадгеринового полипептида. 1, 3 – препараты головного мозга крыс на основе гомогенатов в буфере, содержащем 10 мМ ЭДТА.

2, 4 – препараты головного мозга крыс на основе гомогенатов в буфере, содержащем 10 мМ хлорида кальция.

1, 2 – анализ проведен с поликлональными антителами anti-N-cad-сут;

3, 4 – анализ проведен с поликлональными антителами R-156.

Как свидетельствуют полученные экспериментальные данные, экспрессия белка N-CAM1 может выступать в качестве маркера нормального постнатального развития и старения сердечных и скелетных мышц организма млекопитающих. Кадгериновая экспрессия в этих условиях не претерпевает существенных изменений. Вместе с тем, экспонирование кадгеринов на поверхности клеток при эмбриогенезе можно рассматривать как маркер нормального развития определенного органа. Нами проведено исследование экспонирования белка CDH2 во время эмбрионального развития поджелудочной железы человека с использованием иммуногистохимического метода. Определено, что на 8 неделе эмбрионального развития поджелудочной железы экспрессия белка CDH2 связана преимущественно с клетками протоков и периферийными регионами островков Лангерганса. На двенадцатой неделе эмбрионального развития поджелудочной железы, когда островковые клетки приобретают четкую локализацию, в них тоже можно наблюдать экспонирование белка CDH2.

Роль белков клеточной адгезии иммуноглобулинового и кадгеринового семейства при формировании реакции пассивного избегания у крыс. Молекулы клеточной адгезии также чрезвычайно важны в процессе формирования памяти. Закрепление полученного навыка у млекопитающих связано с повышением экспрессии АБ в зоне неокортекса и гиппокампа [Becker C.G., 1996]. Но если для АБ Ig-семейства участие в процессе формирования памяти считается доказанным, то роль кадгериновых белков в этом процессе длительное время оставалась невыясненной [Жерносовых Д.Д., 2000]. В пользу вовлечения белка CDH2 в процесс обучения свидетельствует тот факт, что этот белок в значительном количестве присутствует в синаптических мембранных фракциях мозга, а ассоциированный с этим кадгерином бета-катенин необходим для консолидации памяти у животных [Bruses J.L., 2006; Maguschak K.A., 2008].

Нами была предпринята попытка выяснить роль белка CDH2 в формировании условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ). Для выработки УРПИ использована модель эксперимента, подробно описанная в работе [Жерносовых Д.Д., Неруш П.А., 2000]. Животные были разделены на 4 группы, в каждой из которых было по две контрольные и четыре экспериментальные крысы. Через 6 часов после окончания выработки УРПИ животные подлежали анестезии (калипсол, 5 мг/кг, внутривенное введение). Каждому экспериментальному животному из первых двух групп через трепанационное отверстие вводили антитела к белку N-CAM1 (первая группа) и белку CDH2 (вторая группа) в соматосенсорную зону коры головного мозга. Экспериментальным крысам двух других групп вводили соответствующие антитела в дорсальную область гиппокампа (третья группа – антитела к N-CAM1, четвертая группа – антитела к белку CDH2). Приобретенный навык тестировали через сутки после выработки УРПИ. Результаты эксперимента показали, что введение антител к белку N-CAM1 через 6 часов после выработки реакции пассивного избегания вызывало полную

потерю навыка у экспериментальных животных первой и третьей групп. Амнезийный эффект у этих животных сохранялся в течение трех суток. Во всех контрольных животных этих групп навык избегания сохранялся полностью и животные не пробовали зайти в неосвещенную часть камеры. Наблюдалось сохранение навыка. У всех экспериментальных животных второй и четвертой групп, которым вводили антитела к белку CDH2 в соматосенсорную зону коры головного мозга и в гиппокамп, наблюдалось полное сохранение навыка. Отсутствие эффекта N-кадгериновых антител можно объяснить следующим образом. Как было отмечено в работе Maguschak K.A. et al, 2008, изменения, касающиеся бета-катенина и его ассоциации с соответствующим кадгерином, характерны для процесса консолидации памяти, однако, как свидетельствуют полученные нами результаты, экспонирование белка CDH2 в синаптических структурах мозга не является критическим для формирования навыка.

Модулирующее влияние плазминогена/плазмина на формирование адгезивных связей между тромбоцитами при агрегации. Образование адгезивных контактов между клетками крови, в частности – между тромбоцитами, является специфическим процессом, поскольку при нахождении крови в жидком состоянии эти клетки должны быть разделены. Активация тромбоцитов приводит к быстрому экспонированию на их поверхности специфических АБ, которые либо находились на поверхности клеток в неактивном состоянии (интегрины), либо находились в секреторных гранулах (селектины, витронектин и др.). Образование межтромбоцитарных связей – сложный процесс, в котором прочность контакта обеспечивается не только взаимодействием адгезивного рецептора на поверхности клеток со специфическим лигандом, но и влиянием других компонентов, составляющих клеточное окружение. Среди таких компонентов особое внимание привлекает плазминоген, который способен выступать в роли адгезивного лиганда клеток крови [Lishko V.K., 2004]. При активации тромбоцитов количество плазминогена, связывающегося с этими клетками, возрастает в несколько раз [Miles L.A., 1985]. К тому же, плазминоген способен образовывать связи с адгезивными белками, секретируемыми во время активации и остающимися связанными с тромбоцитарной поверхностью, и, таким образом, может оказывать модулирующее влияние на образование межклеточных контактов. Glu-плазминоген специфически связывается с плазматической мембраной различных типов клеток, превращается в Lys-форму, что необходимо для ускорения скорости активизации и выполнения им биологических функций. Образование плазмина на поверхности клеток является универсальным механизмом для всех типов клеток и обеспечивает миграцию, пролиферацию, инвазию, гидролиз белков экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ), активацию металлопротеиназ и факторов роста. Плазминоген/плазминовая система играет решающую роль в ремоделировании клеточной поверхности и белков ЭЦМ, а также вовлекается в регуляцию межклеточных адгезивных контактов и контактов клетка-межклеточный матрикс. В научной литературе предложены механизмы, по которым плазминоген/плазминовая система способна оказывать

влияние на адгезивные контакты. Среди них – ингибирование адгезии путем гидролитического воздействия плазмина на ламинин, фибрин и фибронектин; содействие образованию новых межклеточных контактов, что обеспечивается миграцией клеток в результате протеолитического действия плазмина. Вместе с тем, Glu- плазминоген способен принимать участие в межклеточных контактах в качестве поливалентного лиганда [Deryugina E.I., 2012].

Нами проведено исследование влияния Glu- и Lys-форм плазминогена на агрегацию тромбоцитов, стимулированную различными агонистами. Эффекты плазминогена на агрегацию тромбоцитов человека исследовали методом оптической агрегометрии с использованием 2-х модельных систем – ОТП крови и отмытых тромбоцитов. На рис. 14 приведены типичные агрегатограммы тромбоцитарной агрегации, индуцированной различными агонистами в присутствии Lys-плазминогена.

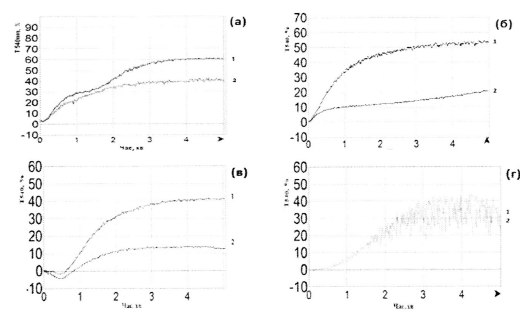


Рис. 14. Влияние Lys-плазминогена на агрегацию тромбоцитов человека, стимулированных различными агонистами (ADP, тромбин, коллаген, ристомидин соответственно): 1 – контрольная агрегация, 2 – агрегация в присутствии Lys-Plg в конечной концентрации: (а) – 6 мкМ, (б-г) – 1,2 мкМ.

Добавление к инкубационной смеси Lys-плазминогена в концентрации 1,2 мкМ приводит к угнетению тромбин- и коллаген-индуцированной агрегации препарата отмытых тромбоцитов. В обоих случаях степень и скорость агрегации снижается примерно вдвое. Вместе с тем, агглютинация тромбоцитов, индуцированная ристомидином, не подавляется Lys-плазминогеном. Таким образом, этот лиганд не оказывает ингибирующего влияния на адгезивные контакты, которые обеспечиваются гликопротеином GP Ib-IX-V и фактором фон Виллебранда. Действие Lys-плазминогена направлено на контакты, которые опосредованы взаимодействием $\beta 3$ -интегринов с их лигандами. Межбелковые взаимодействия плазминогена обычно реализуются с

участием LBS, расположенных в его крингловых доменах. Аналог лизина 6-аминогексановая кислота блокирует LBS зимогена и нарушает эти взаимодействия. Поэтому в дальнейшем изучали эффект 6-АГК на ингибирование Lys-плазминогеном агрегации тромбоцитов. Установлено, что в концентрациях 0,05 – 0,5 мМ 6-АГК ослабляет антиагрегационный эффект Lys-плазминогена, тогда как в присутствии 1 мМ 6-АГК снижение степени тромбин-индуцированной агрегации под действием Lys-плазминогена не наблюдается (рис. 15).

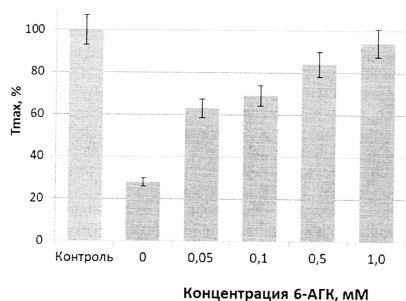


Рис. 15. Ингибирование Lys-плазминогеном (1,2 мкМ) тромбин-индуцированной агрегации отмывших тромбоцитов в присутствии 6-аминогексановой кислоты (n = 3). Контроль – тромбин-индуцированная агрегация.

6-АГК проявляет подобный эффект на ингибирование Lys-плазминогеном агрегации тромбоцитов, стимулированных коллагеном. При этом 6-АГК в указанных концентрациях не влияет собственно на процесс агонист-индуцированной агрегации. Чтобы оценить вклад серинпротеиназного домена плазминогена в реализацию антиагрегационного эффекта Lys-плазминогена, была проведена серия экспериментов с ингибитором сериновых протеиназ – аprotинином. Ингибитор использовали в концентрации 5,5 МЕ/мл. Выбранная концентрация аprotинина ингибирует активность наномолярной концентрации плазмина в среде агрегации, однако не подавляет собственно процесс агрегации тромбоцитов, стимулированных тромбином.

По данным литературы, аprotинин способен с высоким сродством обратимо связываться с плазмином ($K_i = 2.3 \cdot 10^{10}$ М). Нами показано, что снижение степени и скорости тромбин-индуцированной агрегации под влиянием Lys-плазминогена наблюдается в присутствии аprotинина (табл. 1).

Таблица 1

Влияние плазмина и аprotинина на ингибирование Lys-плазминогеном агрегации тромбоцитов, стимулированных тромбином ($M \pm m$; n = 6)

	Максимальная амплитуда агрегации, %	Скорость агрегации на 30 с, %/мин
Контрольная агрегация	44,60 ± 9,51	18,25 ± 6,23
1,2 мкМ Lys-плазминогена	17,70 ± 2,51*	7,42 ± 5,47*
1,2 нМ плазмина	42,60 ± 3,36	17,26 ± 4,88
5,5 МЕ/мл аprotинина	45,36 ± 5,68	18,00 ± 5,19
1,2 мкМ Lys-плазминогена + 5,5 МЕ/мл аprotинина	15,75 ± 4,35*	5,20 ± 1,06*

Отличия в сравниваемых группах являются статистически значимыми ($p < 0,05$): * - сравнительно с показателями «Контрольной агрегации».

Если ингибирующее влияние Lys-плазминогена на агрегацию тромбоцитов не обусловлено действием серин-протеиназного домена, то вполне вероятно, что такое действие опосредуется кринглосодержащими доменами зимогена. В работе изучалось действие кринглосодержащих фрагментов плазминогена – K1-3, K4, K5 и Val 442-плазминогена (миниплазминогена) – на агрегацию отмывших тромбоцитов человека, индуцированную тромбином. Для модуляции агрегационной способности тромбоцитов препараты крингловых фрагментов K1-3, K4 и K5 добавляли в наиболее эффективной концентрации для Lys-плазминогена (1,2 мкМ), а также в 5-кратном избытке (учитывая меньшее количество LBS в составе каждого крингла по сравнению с целевой молекулой и их функциональные различия). Использовали кринглосодержащие фрагменты молекулы в качестве конкурентов Lys-плазминогена в среде агрегации. Для этого перед внесением Lys-плазминогена (1,2 мкМ) и тромбина (1 ед. NIH/мл) суспензию неактивированных тромбоцитов инкубировали в течение 1 мин с препаратами K1-3, K4 или K5 в концентрациях 0,12 – 1,2 мкМ.

Оказалось, что фрагмент плазминогена K5 является наиболее эффективным при восстановлении агрегации тромбоцитов, которая подавлялась Lys-плазминогеном. Кроме того, в присутствии эквимольных концентраций K5 и Lys-плазминогена наблюдается тенденция к незначительной стимуляции агрегации. Конкурентная способность кринглосодержащих фрагментов плазминогена является свидетельством тождественности их сайтов связывания с таковыми в Lys-плазминогене и, возможно, между собой.

Таким образом, Lys-плазминоген, который, в отличие от Glu-формы, имеет открытую конформацию, оказывает ингибирующее воздействие на агрегацию тромбоцитов, индуцированную ADP, тромбином и коллагеном. Ингибирующий эффект Lys-формы зимогена опосредован LBS его крингловых структур и является специфическим, поскольку не определяется при адгезивных контактах, обеспечиваемых гликопротеином GP Ib-IX-V и фактором фон Виллебранда.

Влияние плазминогена на перестройку актинового цитоскелета тромбоцитов при их активации. Активация тромбоцитов в ответ на действие агонистов (тромбин, коллаген, ADP) предусматривает изменения морфологии и физико-химических свойств этих клеток: образование псевдоподий; высвобождение секреторных гранул; экспонирование интегринов и рост их аффинности к адгезивным лигандам; перераспределение фосфолипидов на поверхности плазматической мембраны. Реорганизация актинового цитоскелета обеспечивает координированное протекание каскада реакций внутриклеточного сигналинга. Особую роль в ходе активации и агрегации тромбоцитов играет мембранный кортекс, сформированный из коротких актиновых филаментов в комплексе с актин-ассоциированными белками (спектрином, винкулином, таллином, α -актинином, киндлин и др.). Результаты иммуноблоттинга и данные денситометрического анализа изображений блоттинга показывают, что в неактивированных тромбоцитах актин представлен в трех формах: содержание G-актина и MC-актина составляет около 55 и 40% относительно количества F-формы соответственно (рис. 16, а и б, группа «Интактные Тц»).

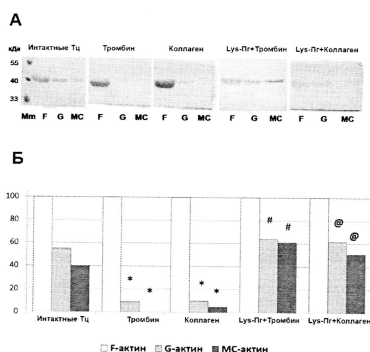


Рис. 16. Влияние Lys-плазминогена на перестройку актинового цитоскелета тромбоцитов при условии их активации тромбином и коллагеном: **А** – иммуноблот актинсодержащих белковых фракций интактных и активированных тромбоцитов; **Б** – относительное содержание форм актина тромбоцитов в белковых фракциях (* – $P < 0,05$ по сравнению с группой «Интактные тромбоциты»; # – $P < 0,05$ по сравнению с группой «Тромбин»; @ – $P < 0,05$ по сравнению с группой «Коллаген»), Mm – маркеры молекулярной массы; F – филаментный актин; G – глобулярный актин; MC – актин мембранного кортекса; Тц – тромбоциты.

Активация тромбоцитов тромбином и коллагеном приводит к существенному уменьшению пулов G- и MC-актина. Результаты количественного анализа показали, что содержание G-актина в активированных тромбоцитах снижается до 10% относительно количества F-формы, тогда как пул MC-актина практически отсутствует (рис. 16, группы «Тромбин» и «Коллаген»). Такое уменьшение пула мономерной формы актина является следствием интенсивного фибрилlogenеза, индуцированного агонистами активации. «Исчезновение» пула MC-актина в белковых фракциях активированных тромбоцитов является, вероятно, результатом его ассоциации (и соосаждения во время отделения пулов актина) с пулом актиновых филаментов цитоплазмы. Как свидетельствуют приведенные данные, Lys-плазминоген препятствует перестройке актинового цитоскелета тромбоцитов, стимулированных тромбином и коллагеном, что может быть одним из механизмов антиагрегации Lys-плазминогена.

Влияние плазминогена на экспонирование витронектина на поверхности тромбоцитов в условиях их активации. При изучении адгезивных связей между активированными тромбоцитами было доказано, что для эффективной агрегации необходима связь интегринового рецептора не только с фибриногеном, но и с другими лигандами. Как было показано ранее, витронектин, который секретируется из альфа-гранул тромбоцитов во время активации и остается связанным с поверхностью этих клеток, является важным для формирования адгезивной межтромбоцитарной связи [Reheman A., 2005]. Нами была предпринята попытка выявить влияние двух форм плазминогена на экспонирование витронектина на поверхности тромбин-стимулированных тромбоцитов. Представленные данные характеризуют экспонирование витронектина на поверхности интактных и тромбин-стимулированных отмытых тромбоцитов (рис. 17). Когда Lys-плазминоген находился в инкубационной среде с интактными тромбоцитами, был отмечен рост витронектин-положительных клеток. Введение Glu-плазминогена не имело эффекта (рис. 17).

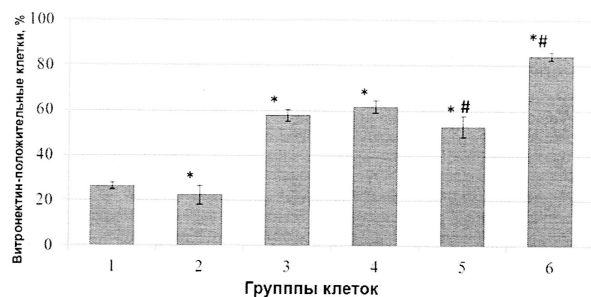


Рис. 17. Эффекты Glu- и Lys-форм плазминогена на экспонирование витронектина на поверхности неактивированных и активированных тромбоцитов: 1 – активированные тромбоциты; 2 – активированные тромбоциты, обработанные Glu-плазминогеном (1,2 мкМ); 3 – активированные тромбоциты, обработанные Lys-плазминогеном (1,2 мкМ); 4 – тромбоциты, активированные тромбином (1 ед. НИИ/мл); 5 – тромбоциты, обработанные Glu-плазминогеном и активированные тромбином; 6 – тромбоциты, обработанные Lys-плазминогеном и активированные тромбином. Различия в сравниваемых группах являются статистически достоверными ($p < 0,05$): * – по сравнению с группой «Неактивированные тромбоциты», # – по сравнению с группой «Тромбоциты, активированные тромбином».

Можно предположить, что связывание Lys-плазминогена с поверхностью тромбоцитарной мембраны приводит к активации клеток и, как следствие, к частичному высвобождению альфа-гранул, а также к ассоциации высвобожденного витронектина с мембраной. При условии предварительной инкубации суспензии тромбоцитов с Lys-плазминогеном и последующей активации тромбином выявлен значительный рост количества витронектин-положительных клеток. В случае Glu-плазминогена не было существенных изменений в количестве витронектин-положительных клеток по сравнению со случаем стимулирования тромбином без предварительной инкубации с плазминогеном. Обобщая полученные нами результаты и данные литературы, мы предположили, что на поверхности активированного тромбоцита с участием Lys-плазминогена могут происходить события, которые изображены на рис. 18. При освобождении альфа-гранул тромбоцитов секретируется олигомерная форма витронектина, половина которой остается связанной с клеточной поверхностью [Parker C.J., 1989].

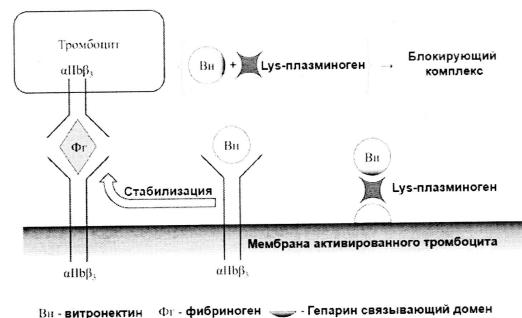
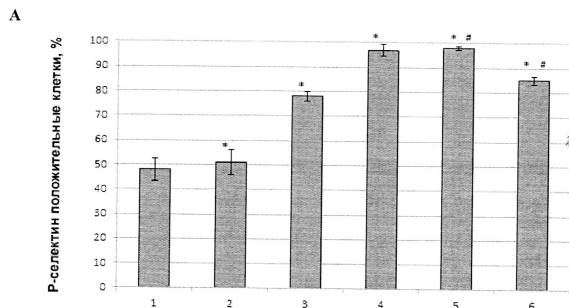


Рис. 18. Схема экспонирования витронектина на поверхности активированного тромбоцита.

Связывание этой формы витронектина с Lys-плазминогеном может вызвать изменения в гепарин-связывающем сайте адгезивного белка, которые непосредственно влияют на адгезивные свойства витронектина. Вероятно, образованный комплекс витронектин-Lys-плазминоген, не будет связываться с интегрином $\alpha\text{IIb}\beta_3$ через стерические препятствия, или его сродство к этому интегринальному рецептору будет ослаблено. Соответственно, это будет влиять на эффективность агрегации и образование межклеточных контактов, поскольку связь витронектина с интегрином $\alpha\text{IIb}\beta_3$ является условием для формирования стабильного межтромбоцитарного контакта с участием фибриногена. С другой стороны, известно, что при активации тромбоцитов увеличивается количество сайтов для связывания плазминогена. Например, один из рецепторов плазминогена – это поверхностный актин, который появляется на мембране тромбоцитов вследствие активации [George J.N., 1980, Tykhomyugov A.A., 2017]. В свою очередь, актин проявляет различную степень сродства к формам плазминогена. Lys-плазминоген имеет большее сродство к актину по сравнению с Glu-плазминогеном [Roka-Moya Y.M., 2014]. Можно предположить, что Lys-плазминоген связывается с поверхностным актином (или с другим поверхностным рецептором) и одновременно образует связь с витронектином, который высвободился из альфа-гранул вследствие активации. Поскольку, по данным литературы, сродство витронектина к Lys-плазминогену намного выше по сравнению с нативной формой профермента, то наблюдается эффект увеличения количества витронектин-положительных клеток. Такая последовательность событий возможна при условии, если в формировании связи с витронектином и актином задействованы различные кринговые структуры молекулы Lys-плазминогена. Таким образом, модулирующее

влияние Lys-плазминогена на экспонирование витронектина на поверхности активированных тромбоцитов можно объяснить за счет образования бивалентной связи профермента с поверхностным рецептором и секретируемым витронектином.

Влияние плазминогена на экспонирование Р-селектина на поверхности активированных тромбоцитов. Следующим этапом было исследование эффектов плазминогена на экспонирование Р-селектина на поверхности тромбоцитов. Р-селектин играет важную роль при образовании межтромбоцитарных адгезивных контактов. По данным литературы, Р-селектин стабилизирует формирование тромбоцитарных агрегатов [Merten M., 2000]. Считают, что стабилизирующий эффект Р-селектина реализуется после образования связи интегрина $\alpha IIb\beta 3$ с фибриногеном. Для Р-селектина найдено несколько рецепторных молекул на поверхности тромбоцитов, среди которых наиболее вероятными является ганглиозиды, содержащие остаток тетрасахаридов [Cooling L.L., 1995]. Поскольку Р-селектин-углеводная связь является достаточно прочной и способна выдерживать значительную нагрузку, считают, что именно ей принадлежит главная роль в стабилизации тромбоцитарных агрегатов [Alon R., 1995]. Проведенные нами исследования экспрессии Р-селектина на поверхности тромбоцитов с использованием цитометрического анализа позволили выявить закономерности, представленные на рис. 19.



Б

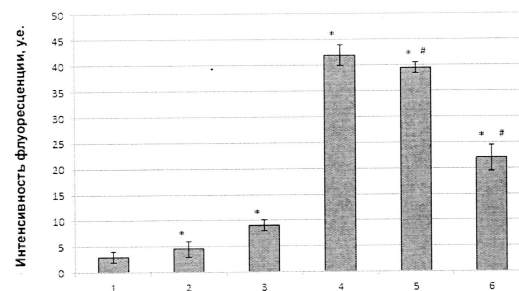


Рис. 19. Эффект Glu- и Lys-плазминогена на экспонирование Р-селектина интактными и активированными тромбоцитами: **А** – процент Р-селектин-положительных клеток; **Б** – интенсивность их флуоресценции. 1 – интактные тромбоциты; 2 – интактные тромбоциты, обработанные Glu-плазминогеном (1,2 мкМ); 3 – интактные тромбоциты, обработанные Lys-плазминогеном (1,2 мкМ); 4 – тромбоциты, активированные тромбином (1 ед. NIH/мл); 5 – тромбоциты, обработанные Glu-плазминогеном и активированные тромбином; 6 – тромбоциты, обработанные Lys-плазминогеном и активированные тромбином. Различия в сравниваемых группах являются статистически достоверными ($p < 0,05$): * – по сравнению с группой «Интakтные тромбоциты», # – по сравнению с группой «Тромбоциты, активированные тромбином».

Как видно из рис. 19, доля Р-селектин-положительных клеток в препаратах интактных тромбоцитов составляла $48 \pm 4,6\%$ от их общего количества (10000 клеток, которые отбирались для анализа). Активация тромбоцитов тромбином в наших экспериментах сопровождалась ростом числа Р-селектин-положительных клеток (почти вдвое), интенсивность их флуоресценции также достоверно повышалась (рис. 19, Б). Влияние Lys-плазминогена приводит к статистически достоверному росту пула Р-селектин-положительных тромбоцитов. Можно предположить, что под действием Lys-плазминогена происходит частичное высвобождение тромбоцитарных альфа гранул. Если интактные тромбоциты инкубировать с Lys-плазминогеном с последующей активацией тромбином, то это приводит к снижению количества Р-селектин-положительных тромбоцитов по сравнению с группой агонист-активированных клеток и к значительному снижению интенсивности флуоресценции (рис. 19). Вместе с тем, прединкубация интактных тромбоцитов с Glu-плазминогеном и последующая активация тромбином не оказывали существенного влияния на количество Р-селектин-положительных клеток и на

интенсивность их флуоресценции. На основании полученных данных можно предположить такую последовательность событий: Lys-плазминоген через взаимодействие с рецепторами на поверхности тромбоцитов вызывает нарушение реконструкции актиновых микрофиламентов и, как следствие, препятствует секреции α -гранул тромбоцитов, что находит отражение в снижении экспонирования Р-селектина на поверхности активированных тромбоцитов.

Таким образом, в работе показано, что в организме млекопитающих функциональные изменения в тканях на определенных этапах развития связаны с изменениями в экспрессии специфических адгезивных белков. Адгезивные взаимодействия между тромбоцитами, которые обеспечивают функциональное назначение этих клеток, в определенной степени модулируются компонентами, циркулирующими в кровотоке – элементами плазминоген/плазминовой системы.

ВЫВОДЫ

Выявлена полифункциональная роль адгезивных белков в создании межклеточных контактов и их дифференцированная экспрессия в онтогенезе и при патологических состояниях, причем уровень экспрессии мРНК нейронального адгезивного белка (NCAM1) существенно меняется в течение постнатального развития организма и сопровождается изменениями в альтернативном сплайсинге, в то время как кальций-зависимая адгезия при этом существенно не меняется. Установлено, что эффективность селективной и интегринавой адгезии в межтромбоцитарных контактах зависит от Lys-плазминогена, компонента плазминоген/плазминовой системы.

1. Показано снижение уровня экспрессии мРНК NCAM1 в скелетных и сердечных мышцах во время постнатального развития и его повышение у старых животных с изменениями в альтернативном сплайсинге, причем как на уровне мРНК, так и белка.

2. Установлено, что в сердечных мышцах уровень экспрессии альтернативного сплайс-варианта мРНК NCAM1, который содержит дополнительный экзон VASE, является высоким, однако в скелетных мышцах он не обнаруживается, что свидетельствует о тканеспецифическом характере такого сплайсинга, хотя некоторые сплайс-варианты обнаружены в обоих типах мышц.

3. Показан высокий уровень экспрессии мРНК кадгерина CDH2 в тканях различного генеза (головной мозг, печень, почки, легкие, сердечные и скелетные мышцы), в то время как экспрессия мРНК CDH1 обнаружена только в печени, почках и легких, а CDH3 преимущественно в почках и легких.

4. Выявлено влияние миллимолярных концентраций ионов кальция на протеолитическую деградацию цитоплазматического домена CDH2, а при отсутствии кальция происходит деградация экстрацеллюлярного домена.

5. Установлено, что CDH2 непосредственно не задействован в формировании условного рефлекса пассивного избегания, что является важным

для выяснения молекулярных механизмов формирования памяти.

6. Выявлен ингибирующий эффект Lys-плазминогена на формирование межтромбоцитарной адгезивной связи, причем ингибирующее действие профермента реализуется благодаря лизин-связывающим сайтам его крингловых структур.

7. Показано, что Lys-плазминоген стимулирует экспонирование витронектина на поверхности активированных тромбоцитов путем образования бивалентной связи с поверхностным рецептором тромбоцитов и витронектином, который высвобождается из альфа-гранул вследствие тромбоцитарной активации.

8. Установлено, что связывание Lys-плазминогена с поверхностным рецептором тромбоцитов сопровождается нарушением актиновых микрофиламентов и снижением экспонирования Р-селектина на поверхности активированных клеток.

9. Показано, что Lys-плазминоген препятствует адгезивным взаимодействиям между тромбоцитами и рассматривается как потенциальный агент, который препятствует избыточному тромбогенезу.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Linnemann D., Gaardsvoll H., Dalseg A.-M., Zhernosekov D., Lundgren T., Edvardsen K., Bock E. Characterization of N-cadherin messenger RNA and polypeptide expression in rat. *Int J Devl. Neuroscience*. 1994. 15(5):441 – 450. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
2. Gaardsvoll H., Krog L., Zhernosekov D., Andersson A.-M., Edvardsen K., Olsen M., Bock E., Linnemann D. Age-related changes in expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) in heart: a comparative study of newborn, adult and aged rats. *Eur J Cell Biol*. 1993. 61(1):100 – 107. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
3. Andersson A.-M., Olsen M., Zhernosekov D., Gaardsvoll H., Krog L., Linnemann D., Bock E. Age-related changes in expression of neural cell adhesion molecule in skeletal muscle: a comparative study of newborn, adult and aged rats / A.-M. Andersson., *Biochem.J*. 1993. 290(Pt 3):641 – 648. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
4. Жерносеков Д. Д. Недзвєцький В. С. Взаємодія білків адгезії зі структурними складовими цитоскелета тваринних клітин. *Український біохімічний журнал*. 1998. 70(1):3-15. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
5. Недзвєцький В. С., Жерносеков Д. Д., Кириченко С. В., Спірина І. Д., Фенсва Я. С. Ідентифікація аутоантитіл, які реагують з цитоскелетними і мембранними білками при нервово-психічних розладах. *Вісник ДНУ ім. О.Гончара*. 2000. Біологія. Випуск 7. С. 246-250. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
6. Жерносеков Д. Д. Білки клітинної адгезії нервової тканини під час нормального розвитку та при патології. Монографія, вид-во Дніпропетровського національного університету. 1998. 80 С. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
7. Жерносеков Д. Д. Нейроспецифічні білки та пам'ять. *Нейрофізіологія*. 2000. 32(5):397 – 401. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
8. Жерносеков Д. Д. Неруш П. А. Роль белков клеточной адгезии N-CAM1 и N-кадгерина при выработке реакции избегания у крыс // *Нейрофизиология*. 2000. 32(6):421 – 423. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
9. Жерносеков Д. Д. Адгезивные белки в процессе воспаления // *Биополимеры и клетка*. 2007. 23(6):483–488. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
10. Жерносеков Д. Д., Куркіна Т. В., Протеїн С: механізми функціонування та методи одержання // *Біотехнологія*. 2008. 1(4):9-17. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
11. Жерносеков Д. Д. Экспрессия нейроспецифических белков клеточной адгезии при опухолевом росте // *Біологічний вісник ХНУ ім. В.Н. Каразіна*. 2001. Физиология и биохимия животных. 5(1-2): 92-94. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
12. Жерносеков Д. Д. Золотарева Э. Н., Кондратюк А. С. Структурно-функциональные особенности ингибитора активатора плазминогена ПАИ-1. *Biopolimers and Cell*. 2010. 26(5):255–264. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
13. Рока-Мойя Я. Жерносеков Д., Золотарева Е., Гриненко Т. Влияние экзогенного Лиз-плазминогена на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов // *Вісник КНУ ім. Т. Шевченка*. 2011. Біологія. № 58: 34–46. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
14. Жерносеков Д. Д. Золотарева Э. Н. Структурно-функциональная характеристика витронектина и его роль в системе гемостаза. *Biopolimers and Cell*. 2011. 27(4):258–263. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
15. Рока-Мойя Я. М., Жерносеков Д. Д., Гриненко Т. В. Влияние плазминогена/плазмина на агрегационную способность тромбоцитов. *Biopolimers and Cell*. 2012. 28(5):352–356. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
16. Жерносеков Д. Д., Юсова Е. И., Гриненко Т. В. Роль плазминогена/плазмина в функционировании клеток крови. *Український біохімічний журнал*. 2012. 84(4):5-19. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
17. Рока-Мойя Я. М., Жерносеков Д. Д., Кондратюк А. С., Гриненко Т. В. Разработка та оптимізація методів визначення активності інгібітора активатора плазминогена 1-го типу в плазмі крові. *Український біохімічний журнал*. 2013. 85(4):111–118. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
18. Тихомиров А. О., Жерносеков Д. Д., Рока-Мойя Я. М., Діордієва С. І., Гриненко Т. В. Влияние Lys-формы плазминогена на реконструкцию актинового цитоскелета тромбоцитов. *Фізіол. журн*. 2014. 60(1):25–33. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
19. Roka-Moya Y. M., Zhernosekov D. D., Yusova E. I., Kapustianenko L. G., Grinenko T. V. The study of the sites of plasminogen molecule which are responsible for inhibitory effect of Lys-plasminogen on platelet aggregation. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2014. 86(5):80–87. *(Особистий внесок: ...)*

- проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).
20. Roka-Moya Y. M., Bilous V. L., Zhernossekov D. D., Grinenko T. V. Novel aspects of platelet aggregation. *Biopolymers and Cell*. 2014. 30(1):10–15. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку)*.
 21. Zhernossekov D.D. Roka-Moya Y. M., Tykhomyrov A.A., Grinenko T.V. Lys-plasminogen stimulates vitronectin exposure on the platelet surface. *Biopolymers and Cells*. 2015. 31(2):104–108. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
 22. Тихоміров А. О. Жерносеков Д. Д., Рока-Мойя Я. М., Діордієва С. І., Гриненко Т. В. Вплив Lys-форми плазміногену на секрецію тромбоцитів людини. *Український фізіологічний журнал*. 2015. 61(6):26–34. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
 23. Zhernossekov D.D. Roka-Moya Y. M., Grinenko T.V. Extracellular annexins in hemostasis system. *Biopolymers and Cell*. 2016. 32(2):98–104. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку)*.
 24. Zhernossekov D. D. Roka-Moya Y. M., Tykhomyrov A. O., Guzyk M. M., Grinenko T. V. Glu- and Lys-forms of plasminogen differentially affect phosphatidylserine exposure on the platelet surface. *Ukr. Biochem. J.* 2017 (89), special issue P. 103–111. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
 25. Tykhomyrov A. O. Zhernossekov D. D., Grinenko T. V. Surface-exposed actin binds plasminogen on the membrane of agonist-activated platelets: a flow cytometry study. *Biopolymers and Cell*. 2017. 33(3):172–182. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
 26. Жерносеков Д.Д. Структурно-функциональные особенности нейроспецифических адгезивных белков иммуноглобулинового семейства // Биополимеры и клетка. 1999. 15(62):143 – 147. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку)*.
 27. Tykhomyrov A.A., Zhernossekov D.D., Guzyk M.M., Kors V.V., Grinenko T.V. Plasminogen modulates formation of reactive oxygen species in human platelets. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2018. 90(6):31–40. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
 28. Чещевик В.Т., Жерносеков Д.Д. Тромбоцитарная агрегация. Механизм участия адгезивных молекул и митохондрий. *Вестник Палесскага дзярж. ун-та. Серыя прыродазнаўчых навук*. 2017. № 2:51–61. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку)*.

29. Жерносеков Д.Д. Роль адгезивных белков в процессе нормального и патологического тромбообразования. *Лабораторная диагностика*. 2007. 2(40): 72–75. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку)*.
30. Жерносеков Д. Д. Экспрессия нейронального белка клеточной адгезии N-CAM1 при старении. *Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету*. 2003. 37(25):72–73. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку)*.
31. Жерносеков Д. Д. Действие стрессовых факторов на процесс обучения животных. *Вісник Луганського національного педагогічного університету*. 2002. 51(7):58–62. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку)*.
32. Сопин Е. О., Жерносеков Д. Д. Влияние тяжелых металлов на функцию белков клеточной адгезии в тканях млекопитающих. *Вісник Луганського національного педагогічного університету*. 2005. 86(6):143–149. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку)*.
33. Спіріна І. Д., Фенєва Я. Є., Бреславська Ю. М., Жерносеков Д. Д., Недзвецкий В. С. Наявність аутоантіл до нейроспецифічних білків у сироватці хворих з різними формами шизофренії / І. Д. Спіріна, Медичні перспективи. 1999. 4(2):46–47. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
34. Жерносеков Д. Д., Гайдар Ю. А., Тихоміров А. Е., Колесниченко В. С., Чёрная В. И. Иммуногистохимическое изучение N-кадгерина в ткани развивающейся поджелудочной железы. *Современные тенденции в развитии медицины и здравоохранения. Днепропетровский государственный университет. Днепропетровск*. 1995. С. 67–68. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
35. Жерносеков Д.Д. Золотарьова Е.М., Рока-Мойя Я.М. Пошук впливу плазміногену на агрегаційну здатність тромбоцитів. *Х Український біохімічний з'їзд, Одеса, Україна, 13-17 вересня 2010 р.*: Український біохімічний журнал. 2010. 82(4, додаток 1):66. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
36. Roka-Moya Y. Tykhomyrov A. A., Guzyk M., Grinenko T. Glu- and Lys-forms of plasminogen distinctly affect platelet aggregation, secretion and phosphatidylserine exposure. 7th TriNet Meeting -RECOOP annual project review meeting. – Budapest, Hungary, October 6-9, 2016. P. 97. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
37. Рока-Мойя Я. М. Жерносеков Д. Д., Гриненко Т. В. Вплив компонентів плазміноген-плазмінової системи на агрегацію та секрецію тромбоцитів. «Молодь та поступ біології»: VIII Міжнародна наукова конференція

- студентів та аспірантів, Львів, Україна, 3-6 квітня 2012 р.: Збірник тез. Львів, 2012. С. 71-72. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
38. Рока-Мойя Я. М. Плазміноген модулює зв'язування екзогенного анексину V тромбоцитами людини. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2016. 88(4):114. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
 39. Жерносеков Д. Д. Регуляция функциональной активности тромбоцитов человека компонентами плазминоген-плазминовой системы. Материалы. Международной научно-практической конференции «Современные проблемы естествознания в науке и образовательном процессе». Минск. 2015. С. 16-17. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
 40. Roka-Moya Y.M., Zhernossekov D.D., Grinenko T.V. Inhibitory effect Lys-plasminogen on washed platelet aggregation induced by different. Aktualne problemy nowoczesnych nauk, Przemysl, Polska, 07-15 czerwca 2012: Materiały konferencji. 2012. Volume 40. Nauk biologicznych. Rolnictwo. Weterynaria. Przemysl, Nauka i studia. S. 20-27. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
 41. Bilous V., Roka-Moiia Y. M. Zhernossekov D. D. Concerning the mechanism of inhibitory effect of Lys-plasminogen on the aggregation of human platelets. Inderdisciplinary scientific conference «Adaptation strategies of the living systems». Kyiv. 2014. P. 4-5. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
 42. Roka-Moiia Y. M. Zhernossekov D. D., Grinenko T. V. Platelets as regulators of plasminogen activation system. 5th TriNet Meeting -RECOOP annual project review meeting. Wroclaw, Poland, October 17-19, 2014. P. 46-47. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
 43. Рока-Мойя Я.М., Жерносеков Д.Д., Гриненко Т.В. Про механізм інгібувального ефекту Lys-плазміногену на агрегацію тромбоцитів людини. Конференція-конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», Київ, Україна, 6-7 червня 2013 р.: Український біохімічний журнал. 2013. 85(4):147. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
 44. Рока-Мойя Я.М. Жерносеков Д.Д., Рыбачук В.Н., Гриненко Т.В. Влияние антикоагулянтных препаратов на основе гепарина на агрегацию и секрецию тромбоцитов. «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки»: IV Научно-практическая конференция, Владикавказ, РФ, 17-18 июня 2013 г.: Материалы конференции, Часть 1. Владикавказ, 2013. С. 247-251. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
 45. Roka-Moya Y. M. Zhernossekov D. D., Grinenko T. V. Effect of Lys-plasminogen on platelet functions. 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia,

- July 6-11 2013: FEBS Journal. 2013. 280(1):195. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
46. Рока-Мойя Я. М. Роль доменів плазміногену в забезпеченні інгібування Lys-плазміногеном агрегації тромбоцитів. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу Київ. 2014. С. 76. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
 47. Гриненко Т. В. Плазміноген/плазминова система. Нові уявлення про фізіологічну та патофізіологічну роль. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу Київ. 2014. С. 21. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
 48. Білоус В. Л. Рока-Мойя Я., Жерносеков Д. Д. Ефекти плазміногену та гепарину на агрегацію та секрецію тромбоцитів людини. Матеріали IX Міжнародної наукової конференції «Молодь і поступ біології», Львів. 2013. С. 33-34. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
 49. В. Гришук Я. Рока-Мойя, Г. Березницький Порівняльна характеристика способів очистки протеїну С (Сравнительная характеристика способов очистки протеина С). Вісник КНУ ім. Т.Шевченка. – 2010. – Проблеми регуляції фізіологічних функцій. №13. С. 39-43. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
 50. Zhernossekov D.D. Grinenko T.V. Extracellular annexins in hemostasis system. Plasminogen influence on annexin A5 exposure. //International conference "Food safety control, Ukraine-EU:unsolved questions" 2018. Kyiv, 127-128. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
 51. Тихомиров А. А. Антиостатины: генерация и роль в норме и патологиях, ассоциированных со старением // *Ukrainian Biochemical Journal*. 2006. 78(3):60-61. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
 52. Sopin Y. O. Zhernossekov D. D. Influence of metal ion on the function of cell adhesion molecules in the nervous tissue. Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти, Донецьк. 2005. 1(1):114. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
 53. Жерносеков Д. Д. Экспрессия кальций-зависимого адгезивного белка N-кадгерина в процессе развития и старения тканей животных. Материалы VI Международного симпозиума "Биологические механизмы старения" Харьков. 2004. С. 21-22. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
 54. Котельник О. А. Экспрессия нейроспецифического адгезивного белка N-CAM1 в структурах мозга крыс при гемолитической анемии.

- Фізіологічний журнал. 2002. 48(2):25-26. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
55. Zhernossekov D. D., Nerush P. A., Gritsan V. U. The role of neural cell adhesion molecule N-CAM1 in aging processes. Матеріали V Міжнародного симпозиума "Биологические механизмы старения" Харьков. 2002. С. 49. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
 56. Zhernossekov D. D., Nerush P. A., Gritsan V. U. Role of N-cadherin in animals' learning process. Архив клинической и экспериментальной медицины. 2001. 10(2):157. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
 57. Недзвезцький В. С., Жерносеков Д. Д., Кіріченко С. В. Нейроспецифічні білки проміжних філаментів нейронів та гліальних клітин і молекули адгезії клітин при пошкодженні нервової тканини. Матеріали V Міжнародної конференції «Франція та Україна, науково-практичний досвід у контексті діалогу національних культур», Дніпропетровськ. 1998. № 2:82-83. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
 58. Недзвезцький В. С. Нейроспецифічні білки цитоскелета та адгезії нервових клітин при нейроектомії / В. С. Недзвезцький, Д. Д. Жерносеков, С. В. Кіріченко. Матеріали VII Українського Біохімічного з'їзду, Київ. 1997. С. 156. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
 59. Zhernossekov D. D., Nedzvetsky V. S., Tikhomiroff A. A. Etude des proteines neurospecifiques dans les regions du cerveau responsables de formation de la memoire. Матеріали IV Міжнародної конференції «Франція та Україна, науково-практичний досвід у контексті діалогу національних культур», Дніпропетровськ. 1997. № 2:126. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
 60. Zhernossekov D. D. Immunohistochemical study of N-cadherin in developing human pancreas. European HPB Surgery. 1995. 9(1):146. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
 61. Chornaya V. Neurospecific proteins in the presence of risk factors at children. 23th Meeting of FEBS. 1995. P. 163. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
 62. Березин В. А. Экспрессия нейроспецифических белков клеточной адгезии (N-CAM1) и промежуточных филаментов (ГФКБ) в перевиваемых крысиных глиомах. Функции нейроглии. Тбилиси: Мецниереба. 1993. С. 259 – 265. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

63. Білоус В. Л., Рока-Мойя Я. М., Жерносеков Д. Д., Юсова О. І., Капустяненко Л. Г., Гриненко Т. В. Вплив плазміногену та його фрагментів на агрегаційну здатність тромбоцитів. «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології»: 2-га Міжнародна наукова конференція, м. Дніпропетровськ, Україна, 24-25 вересня 2013: Матеріали конференції. 2013. С. 76. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
64. Roka-Moya Y. M., Kapustianenko L. G., Zhernossekov D. D., Yusova E. I., Grinenko T. V. Plasminogen kringle 5 abolishes the inhibitory effect of Lys-plasminogen on platelet aggregation. IX Jakub K. Parnas Conference «Proteins from birth to death», Jerusalem, Israel, 29 September – 2 October 2013: Program & Abstract Book, P65. 2013. P. 94. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
65. Рока-Мойя Я. М., Білоус В. Л., Жерносеков Д. Д., Рыбачук В. Н., Гриненко Т. В. Разработка и валидация метода определения активности ингибитора активатора плазминогена I типа в плазме крови. «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки»: V Научно-практическая конференция, Владикавказ, РФ, 18-21 июня 2014 г.: Матеріали конференції. – Владикавказ, 2014. С. 176–179. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
66. Roka-Moiia Y. M., Zhernossekov D. D. Mechanism of inhibition of human platelet aggregation by Lys-plasminogen. I Congress «BIO 2014», Warsaw, Poland, September 9-12 2014: Acta Biochimica Polonica. 2014. 61(Sup. 1):159. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
67. Рока-Мойя Я. М. Роль доменів плазміногену у забезпеченні інгібування Лys-плазміногеном агрегації тромбоцитів / Я. М. Рока-Мойя, В. Л. Білоус, Л. Г. Капустяненко, Д. Д. Жерносеков. XI Український біохімічний з'їзд, Київ, Україна, 6-10 жовтня 2014 р.: Український біохімічний журнал. 2014. 86(5, додаток 1):76. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

АНОТАЦІЯ

Жерносков Д.Д. Поліфункціональна роль адгезивних протеїнів в міжклітинних контактах тканин ссавців в онтогенезі та за патологічних станів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 «Біохімія». – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2019.

Робота присвячена визначенню ролі адгезивних протеїнів за умов нормального розвитку та при функціональних порушеннях в організмі ссавців.

Досліджено експресію нейронального протеїну клітинної адгезії N-CAM1 під час розвитку та старіння тканин. Для протеїну N-CAM1 досліджено експресію додаткових екзонів в скелетних та серцевих м'язах щура під час постнатального розвитку. Визначено мРНК, що відповідають за синтез ізоформ протеїну N-CAM1 у скелетних та серцевих м'язах. Показано, що під час постнатального розвитку скелетних та серцевих м'язів експресія мРНК, що кодують протеїн N-CAM1 знижується, а під час старіння – підвищується. Досліджено експресію додаткових екзонів в мРНК протеїну N-CAM1 у скелетних та серцевих м'язах під час постнатального розвитку. Встановлено, що експресія цих екзонів пов'язана головним чином з мРНК розміром 5,2 та 2,9 кб. Показано, що додатковий екзон VASE, для якого характерна експресія в мРНК N-CAM1 серцевих м'язів, в скелетних м'язах практично не визначається. Зроблено висновок про тканиноспецифічну експресію цього екзону. Досліджено поліпептидний склад ізоформ протеїну N-CAM1 у серцевих та скелетних м'язах щурів. Показано, що кількість адгезивного протеїну N-CAM1 в серцевих та скелетних м'язах змінюється відповідно до віку тварини: знижується під час постнатального розвитку та підвищується під час старіння, що свідчить про залучення цього протеїну до компенсаторних механізмів, які мають місце у м'язах під час старіння ссавців.

Досліджено експресію N-кадгерінового поліпептиду в тканинах щура. На відміну від N-CAM1 не виявлено суттєвих змін в експресії мРНК кадгерінового протеїну під час постнатального розвитку скелетних та серцевих м'язів щура. Показано, що кальцій-залежна адгезія в тканинах ссавців реалізується завдяки певному набору близькородинних кадгеринів, причому кожен з досліджуваних кадгеринів має специфічний тканинний розподіл.

Використання моделі вироблення умовного рефлексу пасивного уникнення не показало критичної ролі протеїну CDH2 в процесі навчання. Виявлено, що блокування кадгерінових протеїнів за допомогою антитіл в структурах гіпокампу та кори головного мозку не є критичним для формування навичку у дослідних тварин.

Показано, що компоненти плазміноген/плазмінової системи створюють модулюючий вплив на адгезивні взаємодії між тромбоцитами. Lys-плазміноген, на

відміну від Glu-форми, створює інгібувальний вплив на агрегацію тромбоцитів, індуковану ADP, тромбіном та колагеном. Показано, що інгібувальний ефект Lys-форми зимогену опосередкований LBS його кринглових структур. Не виявлено інгібувального впливу Lys-плазміногену на адгезивні контакти, що забезпечуються глікопротеїном GP Ib-IX-V та фактором фон Віллебранду.

Встановлено, що Lys-плазміноген перешкоджає перебудові актинового цитоскелету тромбоцитів, стимульованих тромбіном та колагеном, що може бути одним із механізмів антиагрегаційної та антисекреторної дії Lys-плазміногену, оскільки встановлено, що попередня інкубація клітин з Lys-плазміногеном та наступною активацією тромбіном призводить до зниження кількості P-селективних тромбоцитів.

Доведено модулюючий вплив Lys-плазміногену на експонування адгезивного протеїну вітронектину на поверхні активованих тромбоцитів. Запропоновано механізм бівалентного зв'язку Lys-плазміногену з поверхневим рецептором та вітронектином, який вивільняється з альфа-гранул внаслідок тромбоцитарної активації.

Таким чином, доведено, що в організмі ссавців функціональні зміни в тканинах на певних етапах розвитку пов'язані зі змінами в експресії специфічних адгезивних протеїнів. Адгезивні взаємодії між тромбоцитами, які забезпечують функціональне призначення цих клітин, регулюються елементами плазміноген/плазмінової системи.

Ключові слова: протеїни клітинної адгезії, міжклітинні контакти, плазміноген/плазмінова система.

АННОТАЦИЯ

Жерносков Д.Д. Полифункциональная роль адгезивных белков в формировании межклеточных контактов в тканях млекопитающих в онтогенезе и при патологических состояниях. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.04 – Биохимия. Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины. – Киев, 2019.

Работа посвящена роли адгезивных белков при нормальном развитии и при функциональных нарушениях в организме млекопитающих.

Исследована экспрессия нейронального белка клеточной адгезии N-CAM1 в онтогенезе скелетных мышц. Определены мРНК, которые отвечают за синтез изоформ белка N-CAM1 в скелетных и сердечных мышцах. Показано, что во время постнатального развития скелетных и сердечных мышц экспрессия мРНК, которые кодируют белок N-CAM1 снижается, а при старении – повышается. Исследована экспрессия дополнительных экзонов в транскриптах N-CAM1 в скелетных и сердечных мышцах крысы в различные сроки постнатального развития. Установлено, что экспрессия этих экзонов наблюдается в мРНК, которые имеют размер 5,2 та 2,9 кб. Показано, что экзон

VASE, для которого характерна экспрессия в мРНК сердечных мышц, в скелетных мышцах практически не определялся. Сделан вывод о тканеспецифической экспрессии этого экзона в мРНК N-CAM1. Исследован полипептидный состав изоформ белка N-CAM1 в скелетных и сердечных мышцах крысы. Показано, что количество белка N-CAM1 в скелетных и сердечных мышцах изменяется в соответствии с возрастом животного: наблюдается снижение в период постнатального развития и повышение при старении, что свидетельствует о вовлечении этого белка в компенсаторные механизмы, свойственные мышцам при старении животных.

Исследована экспрессия N-кадгеринового полипептида в тканях крысы. В отличие от белка N-CAM1 не выявлено существенных изменений в экспрессии мРНК N-кадгерина в различные сроки постнатального развития скелетных и сердечных мышц. Показано, что кальций-зависимая адгезия в тканях млекопитающих реализуется благодаря определенному набору близкородственных кадгеринов, причем каждый из исследуемых кадгеринов имеет тканеспецифическое распределение. Показано, что в тканях млекопитающих N-кадгерин представлен главным образом полипептидом с молекулярной массой 130 кДа. Использование модели формирования условного рефлекса пассивного избегания не показало критической роли N-кадгерина в процессе обучения. Блокирование кадгериновых белков с помощью антител в структурах гиппокампа и коры головного мозга не было критичным для формирования навыка у исследуемых животных.

Показано модулирующее влияние плазминоген/плазминовой системы на формирование адгезивных контактов между тромбоцитами. Lys-плазминоген, в отличие от Glu-формы, оказывает ингибирующее действие на агрегацию тромбоцитов, индуцируемую ADP, тромбином и коллагеном. Показано, что ингибирующий эффект Lys-формы зимогена опосредован LBS его крингловых структур. Ингибирующего влияния Lys-плазминогена на адгезивные контакты, обеспечиваемые гликопротеином GP Ib-IX-V и фактором фон Виллебранда не выявлено. Установлено, что Lys-плазминоген нарушает перестройку актинового цитоскелета тромбоцитов, стимулированных тромбином и коллагеном, что может быть одним из механизмов антиагрегаторного и антисекреторного действия Lys-плазминогена, поскольку показано, что предварительная инкубация клеток с Lys-плазминогеном с последующей активацией тромбином приводит к снижению количества P-селективных тромбоцитов. Доказано модулирующее влияние Lys-плазминогена на экспонирование адгезивного белка витронектина на поверхности активированных тромбоцитов. Предложен механизм бивалентного связывания Lys-плазминогена с поверхностным рецептором и витронектином, который высвобождается из альфа-гранул при тромбоцитарной активации.

Таким образом, доказано, что в организме млекопитающих функциональные изменения в тканях на определенных этапах развития организма связаны с изменениями в экспрессии специфических адгезивных белков. Адгезивные взаимодействия между тромбоцитами, которые

обеспечивают функциональное назначение этих клеток, регулируются плазминоген/плазминовой системой.

Ключевые слова: белки клеточной адгезии, межклеточные контакты, плазминоген/плазминовая система.

SUMMARY

Zhernoskov D.D. Polyfunctional role of adhesive proteins in the formation of intercellular contacts in mammalian tissues in ontogenesis and under pathological states. – Manuscript.

Thesis for a scientific degree of a doctor of biological sciences by speciality 03.00.04 «Biochemistry». – Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv, 2019.

The thesis describes the peculiarities of expression of adhesive proteins in mammalian tissues under physiological state and pathology.

It was investigated the expression of cell adhesion protein N-CAM1 at the developing and aging tissues. It was determined the expression of minor exons of N-CAM1 in skeletal and heart muscles in rats at the different steps of the postnatal age. The classes of m-RNA that are responsible for synthesis of N-CAM1 isoforms in skeletal and heart muscles were determined. It was found that m-RNA expression of N-CAM1 was decreased during postnatal development, but increased at the aging tissues. The expression of minor exons was investigated in rat skeletal and heart tissue at postnatal development and aging. It was found that this expression was related with m-RNA of 5.2 and 2.9 kb. It was shown that VASE exon, which was expressed in heart, was practically absent in skeletal muscle. It was made the conclusion about tissue specific expression of this minor exon. The expression of N-CAM1 isoforms in skeletal and heart muscles was determined at all ages. There was no correlation between the m-RNA expression and the proportion of polypeptide isoforms of N-CAM1 in skeletal and heart tissue. Quantification of N-CAM1 protein, which was determined by enzyme-linked immunosorbent assay, showed that the amount of this protein was changed according to the animal's age: there was a down regulation during postnatal development but the increase during aging in skeletal and heart muscles. It was concluded that N-CAM1 was involved in the compensatory mechanisms that took place in muscles during the aging of mammals.

The expression of N-cadherin in rat tissues was investigated. Unlike N-CAM1 expression, there were no significant changes in N-cadherin m-RNA expression at all ages of skeletal and heart rat tissues. The classes of m-RNA which are responsible for N-, E- and P-cadherin expression in brain, liver, kidney, lung, heart and skeletal muscles were determined. We concluded that each of the investigated cadherins was characterized by tissue-specific distribution. The analysis of N-cadherin polypeptide isoforms in rat tissues showed the presence of the main isoform with molecular mass 130 kDa. The crucial role of N-cadherin in memory formation was not shown on the model of passive avoidance in rats. The blocking of cadherin proteins with

specific antibodies in brain and hippocampus structures did not lead to disruption of memory formation in animals.

It was shown that components of plasminogen/plasmin system made a modulating effect on adhesive interaction between platelets. Lys-plasminogen unlike Glu-form showed an inhibitory effect on platelet aggregation induced by ADP, thrombin and collagen. It was determined that inhibitory effect of Lys-plasminogen was mediated by LBS of its kringle structures. Lys-plasminogen had no inhibitory effect of on the adhesive contacts which were mediated by GP Ib-IX-V and von Willebrand factor. Lys-plasminogen caused the negative influence on actin rearrangement in platelets stimulated by thrombin or collagen. It could be one of the possible mechanisms of antiadhesive and antiselective action of Lys-plasminogen because, as it was shown, the preliminary incubation of platelets with Lys-plasminogen followed by thrombin stimulation led to the decrease of P-selectin-positive platelets in preparations. Lys-plasminogen had a modulating effect on vitronectin exposure on the surface of activated platelets. We proposed the mechanism of bivalent interaction of Lys-plasminogen with a surface platelet receptor and vitronectin that was released from alpha-granules due to platelet activation.

So, it was proved that functional changes in tissues of mammalian organisms are related with the changes of the expression of specific adhesive proteins. Adhesive interactions between platelets, which provide the functional destination of these cells, are modulated by the components of plasminogen/plasmin system.

Key words: cell adhesion proteins, cell-cell contacts, plasminogen/plasmin system.