Биомедицинская химия, 2018 том 64, вып. 5, с. 387-396.

ОБЗОРЫ

CLEC-2-ИНДУЦИРОВАННАЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ В ТРОМБОЦИТАХ КРОВИ

А.А. Мартьянов[1,2]*, В.Н. Канева[1,3], М.А. Пантелеев[2,3], А.Н. Свешникова[1,2]

[1]Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Физический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2; *эл. почта: aa.martyanov@physics.msu.ru
[2]Центр Теоретических Проблем Физико-химической Фармакологии РАН, 119991, Москва
[3]Национальный медицинский исследовательский центр имени Д. Рогачева, 117997, Москва

Активирующий рецептор семейства лектиновых типа С (C-type lectin, CLEC), CLEC-2, был обнаружен на тромбоцитах человека около десяти лет назад. Известным эндогенным лигандом CLEC-2 является мембранный белок подопланин, экспонируемый клетками лимфатического эндотелия, ретикулярными фибробластами в лимфатических узлах, подоцитами почек, а также клетками некоторых опухолей. CLEC-2 и подопланин участвуют в метастазировании, сепсисе, развитии тромбозов глубоких вен. Сигнальный каскад CLEC-2 включает в себя ряд тирозинкиназ (Syk, SFK, Btk), а также адаптер LAT и фосфолипазу Cγ2, которая запускает кальциевую сигнализацию. CLEC-2 и подопланин, а также участники сигнального каскада CLEC-2, рассматриваются как мишени для антитромбоцитарной терапии.

Ключевые слова: тромбоцит; рецептор CLEC-2; тирозинкиназы; лимфангиогенез; метастазирование; подопланин

DOI: 10.18097/PBMC20186405387

ВВЕДЕНИЕ

Тромбоциты представляют собой фрагменты мегакариоцитов диаметром от 1 до 4 мкм. Хотя тромбоциты не имеют ядра и в зрелом состоянии не синтезируют новые белки, они сохраняют многие функциональные характеристики целых клеток. При нарушении целостности сосуда тромбоциты активируются и агрегируют друг с другом, перекрывая место повреждения, и, таким образом, предотвращая потерю форменных элементов крови [1].

На поверхности тромбоцитов присутствует множество разнообразных белков-рецепторов, обеспечивающих адгезию, агрегацию, активацию и ингибирование активации тромбоцитов. Среди тромбоцитарных рецепторов можно выделить два основных семейства: ассоциированные с G-белками (PAR-1, PAR-4, P_2Y_1, P_2Y_{12}) и ассоциированные с тирозинкиназами (GP-VI, CLEC-2). В обоих семействах есть как рецепторы, обеспечивающие адгезию и агрегацию (основной – интегрин αIIbβ3), так и вызывающие активацию тромбоцита (ассоциированные с G_q и G_i белками или содержащие мотив ITAM), или, наоборот, повышающие порог активации (ассоциированные с G_s белками или содержащие мотив ITIM, например, PECAM-1) [2-4].

Рецепторные G-белки – семейство заякоренных в плазматической мембране с внутренней стороны гетеротримерных GTPаз, являющихся передатчиками сигнала у большинства клеток. G-белки состоят из трёх субъединиц, α, β и γ, их часто классифицируют по типу α-субъединицы (G_q, G_i, G_s и т.п.). Ассоциация связавшего лиганд рецептора с G-белком приводит к замещению GDP на GTP у α-субъединицы и её диссоциации из комплекса. Gα-GTP остаётся заякорена в мембране и может диффундировать вдоль неё, приводя к активации мишеней, определяемых типом G-белка. Отдельно гетеродимер βγ также может передавать сигналы, однако в тромбоците эта система мало изучена. Основной активирующий сигнал для тромбоцита состоит в активации Gαq-субъединицей фосфолипазы С типа β (PLCβ) и образованию инозитол-3-фосфата (IP_3) и диацилглицерола (DAG), приводящих к высвобождению ионов кальция из эндоплазматического ретикулума и активирующих протеинкиназу С (PKC) (рис. 1А). Эти два сигнала вместе приводят к реализации всех ответов тромбоцита на активацию. Активация G-белков также индуцирует активацию Rho-киназ, которые фосфорилируют лёгкие цепи миозина, и, таким образом, приводят к изменению формы цитоскелета [4, 5].

Принятые сокращения: Btk - тирозинкиназа Брутона; CD148 - трансмембранная фосфатаза 148; CLEC - лектин-подобный рецептор С-типа; COX-1 - циклооксигеназа 1; DAG - диацилглицерол; GP-VI - рецептор гликопротеин 6; GSK3 - киназа 3 гликогенсинтазы; IP_3 - инозитол-3,4,5-трисфосфат; ITAM/ITIM - тирозин-содержащий активирующий/ингибирующий мотив иммунорецепторов; LAT - соединительный адаптер Т-клеток; PAR - активируемые протеазами рецепторы; PI3K - фосфоинозитол-3-киназа; PIP-2/3 - фосфоинозитол-4,5-бисфосфат (3,4,5 трисфосфат); PKC - протеинкиназа С; PLAG - домен, стимулирующий агрегацию тромбоцитов; PLCγ2 - фосфолипаза С-гамма 2; PTP1B - белковая тирозинфосфатаза 1В; RhoA-ROCK - ассоциированная с Rho протеинкиназа; SH - Src гомологичный домен; SHP - фосфатаза с Src гомологичным доменом; SFK - семейство Src-киназ; SLP-76 - содержащий SH-2 домен лейкоцитарный белок 76; Syk - тирозинкиназа селезёнки; TxA_2 - тромбоксан A_2.

* - адресат для переписки

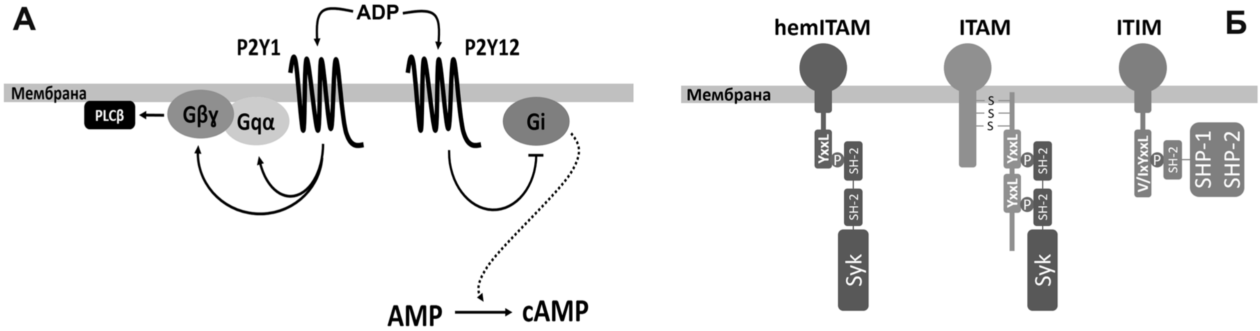

Рисунок 1. А - передача ADP-индуцированного сигнала в тромбоцитах через G-белки. Б - разные типы тирозин-содержащих мотивов в цитоплазматических доменах тромбоцитарных рецепторов и белков-адаптеров.

Ассоциированные с тирозинкиназами рецепторы несут в своих цитоплазматических доменах (или на ассоциированных с цитоплазматическими доменами цепях) иммунные тирозиновые мотивы. Выделяют три мотива (рис. 1Б): ITAM (тирозин-содержащий активирующий мотив иммунорецепторов), hemITAM (полу-ITAM), ITIM (тирозин-содержащий ингибирующий мотив иммунорецепторов) [6, 7]. Каждый из данных мотивов содержит тирозин, который становится доступным для фосфорилирования после связывания рецептора с молекулой активатора. ITAM состоит из двух тирозин-содержащих сигнальных последовательностей YxxL, тогда как hemITAM содержит только одну такую последовательность аминокислот [8]. ITIM-мотив аналогичен hemITAM, однако имеет в своём составе дополнительный валин или изолейцин перед тирозином. После того, как тирозин был фосфорилирован, к нему может присоединяться ряд белков-передатчиков (таких, как Syk, SFK, SHP-1/2 и т.д.), что приводит к дальнейшему распространению сигнала.

Некоторые из hemITAM и ITIM содержащих рецепторов принадлежат к рецепторам Dectin-1 кластера, которые содержат один лектин-подобный домен С-типа. Предполагается, что данное семейство рецепторов возникло в результате дупликации генов. Рецепторы Dectin-1 кластера связывают лиганды независимо от присутствия ионов кальция. Кластер Dectin-1 включает в себя CLEC-1, CLEC-2, Dectin-1, CLEC-9A, CLEC-12A, CLEC-12B, LOX-1. Большинство данных рецепторов может быть найдено на миелоидных клетках, таких как макрофаги и нейтрофилы [9].

Открытый в 2006 году тромбоцитарный рецептор CLEC-2 относится к семейству hemITAM-рецепторов [10, 11]. Показано, что при нарушениях взаимодействия CLEC-2 с подопланином, который экспрессируется эндотелиальныеми клетками лимфокапилляров, лимфатические сосуды у эмбрионов мышей оказываются заполнены кровью после 14-го дня развития эмбриона [12, 13]. Другой ролью CLEC-2, которую он выполняет совместно с ITAM рецептором к коллагену, GP-VI, является поддержание целостности сосудистых стенок микрокапилляров при воспалениях: при индукции воспаления липополисахаридами (ЛПС) у мышей с дефицитом CLEC-2 и (или) GP-VI развивались геморрагии в лёгких [14]. Активация тромбоцитарного CLEC-2 неизвестным эндогенным лигандом способствует стабилизации тромбов в артериолах: при нарушениях в CLEC-2-индуцированной сигнализации или при дефиците CLEC-2 на поверхности тромбоцитов, формирование тромбоцитарного агрегата было нарушено при индуцированном $FeCl_3$ тромбозе [12, 15]. С другой стороны, продемонстрирована роль CLEC-2 в метастазировании ряда злокачественных опухолей (глиом, меланом) [12, 16, 17], развитии тромбозов глубоких вен при частичном стенозе сосуда [18], сепсисе [19].

Целью данного обзора была систематизация знаний о биохимических событиях, происходящих при активации CLEC-2 на поверхности тромбоцитов, а также анализ возможности использования тромбоцитарного CLEC-2 и участников его сигнального каскада в качестве мишеней при терапии заболеваний, развивающихся через рецептор CLEC-2 тромбоцитов.

1. АКТИВАТОРЫ CLEC-2

На сегодняшний день достоверно известно о существовании только одного эндогенного лиганда CLEC-2 – подопланина. Подопланин – трансмембранный гликопротеин I-го типа, который в человеческом организме представлен на поверхности клеток эндотелия лимфокапилляров, альвеолоцитов I-го типа, подоцитов почек, кардиомиоцитов и ретикулярных фибробластов [17]. При воспалении экспрессия подопланина обнаруживается на поверхности макрофагов [17, 19]. С другой стороны, известно, что клетки многих агрессивных злокачественных опухолей (плоскоклеточные карциномы, меланомы, глиомы) также экспонируют подопланин на своей поверхности – это способствует их ускоренной пролиферации и распространению метастазов [16, 20, 21].

Подопланин имеет в своём составе несколько функциональных доменов, называемых PLAG (Platelet Aggregation Stimulated Domain) [17]. Thr34 в PLAG1 и Thr52 в PLAG3 – важные для подопланин-зависимой агрегации тромбоцитов сайты O-гликозилирования [22, 23]. В отсутствие данной модификации подопланин не способен связать тромбоцитарный рецептор CLEC-2 [17].

Благодаря наличию аминокислотной последовательности KKxxxR, подопланин может ассоциироваться с эзрином и моезином – цитозольными белками семейства ERM, взаимодействующими с актином в местах контакта с цитоплазматической мембраной, и известными своим взаимодействием с CD44 (рецептор для гиалуроновой кислоты) [24]. Таким образом, при связывании подопланина (экспонированного, например, на эндотелиальной клетке) и CLEC-2 (на тромбоците), происходит ассоциация цитоплазматических частей подопланина с CD44 (на подопланин-экспонирующей клетке) через ERM-белки. Это приводит к активации и увеличению подвижности экспрессирующих подопланин клеток. Такой механизм работает для раковых стволовых клеток и клеток плоскоклеточных карцином. Подвижность подопланин-экспонирующих клеток повышается, так как CD44 приводит к активации RhoA GTPаз и RhoA-ROCK, которые необходимы для сокращения кортикального актомиозина. Таким образом, взаимодействие CLEC-2-подопланин-CD44 способствует ускорению движения клеток опухолей [17, 25]. Показано, что на поверхности клеток агрессивных злокачественных опухолей количества CD44 и подопланина значительно увеличены [17, 20]. С другой стороны, при экспрессии CD9 (тетраспанина) на поверхности клеток злокачественных опухолей нарушается метастазирование. Это обусловлено тем, что CD9 может связываться с подопланином своими трансмембранными доменами 1 и 2 – это приводит к тому, что последний не способен связываться с тромбоцитарным CLEC-2 (рис. 2) [17, 26].

Предполагается, что существуют и другие эндогенные активаторы CLEC-2 [18, 27]. Так, подопланин не участвует в развитии тромбозов глубоких вен, вызванных стенозом сосуда; однако у дефицитных по CLEC-2 мышей патологического состояния не развивается. Одним из претендентов на роль активатора CLEC-2 в данных условиях является цитозольный белок S100A13, секретируемый клетками сосудистого эндотелия, а также гладкомышечными клетками [18]. Известно, что он секретируется клетками гладкой мускулатуры сосудов в ответ на тепловой шок, окислительный стресс или гипоксию [28, 29].

In vitro показано, что адгезия тромбоцитов к подопланину происходит при низких скоростях сдвига, соответствующих венозному кровотоку: 50–350 $с^{-1}$ [30]. При артериальных скоростях сдвига (>450 $с^{-1}$) адгезия тромбоцитов к подопланину не происходит [30]. При добавлении ингибитора (лотрафибан) активации интегринов αIIbβ3, являющихся основными адгезивными рецепторами тромбоцитов, адгезия к подопланину сохраняется, однако, дальнейшего роста тромба на подложке не происходит [31]. Наконец, продемонстрировано, что адгезия тромбоцитов к подопланину не происходит при ингибировании активности Syk- и SFK-тирозинкиназ, являющихся первичными мессенджерами внутриклеточного сигнала при связывании тромбоцитарного CLEC-2 с лигандами. Адгезия нарушается, но не прекращается при ингибировании PLCγ2, Rac, сигнализации от вторичных мессенджеров активации ADP и TxA_2. Таким образом, можно сделать вывод, что основными регуляторами адгезии тромбоцитов к подопланину являются Syk и SFK киназы [30, 31].

Известными экзогенными активаторами CLEC-2 являются родоцитин (белок, добываемый из яда малайской гадюки *Calloselasma rhodostoma*) [10, 32] и фукоидан, добываемый из бурых водорослей *Fucus vesiculosis* [33-35].

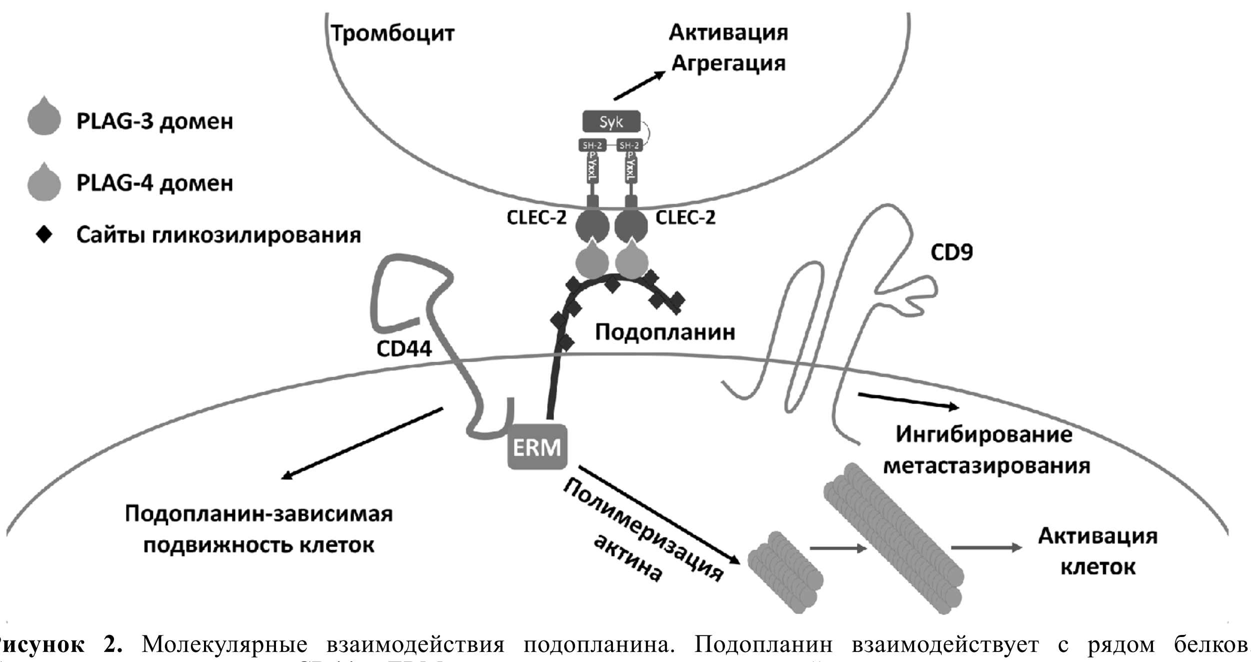

Рисунок 2. Молекулярные взаимодействия подопланина. Подопланин взаимодействует с рядом белков. Связывание подопланина с CD44 и ERM приводит к ускорению клеточной миграции и перестроению актинового цитоскелета. Одновременно это активирует покоящиеся клетки. Связь CLEC-2 и CD9, наоборот, ингибирует метастазирование и связывание подопланина с CLEC-2. Связывание тромбоцитарного CLEC-2 и подопланина приводит к активации и агрегации тромбоцитов [17].

2. ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ ОТ РЕЦЕПТОРА CLEC-2

CLEC-2 – трансмембранный белок II-го типа, N-конец которого находится в цитоплазме тромбоцита, присутствует только один трансмембранный регион, а C-конец находится во внеклеточном пространстве [36]. Внеклеточный домен состоит из “ножки” и углевод-узнающего домена, лектин-подобного домена C-типа (CTLD) [36]. Цитоплазматический домен CLEC-2 состоит из 31 аминокислотного остатка и несёт в своём составе две функциональные последовательности: DED (Death-Effector Domain, один из доменов белков, участвующих в реализации запрограммированной гибели клеток) и расположенную на 7 аминокислотных остатков ниже последовательность YxxL (hemITAM) [37]. DED последовательность необходима для фосфорилирования остатка тирозина в hemITAM последовательности, но не для присоединения к нему SH-2 доменов участников сигнального каскада [37].

Важной для внутриклеточной сигнализации особенностью CLEC-2 является способность мономеров рецептора образовывать нековалентно связанные гомодимеры [36, 38]. На неактивированных тромбоцитах примерно треть рецепторов находится в димеризованном состоянии, а после активации CLEC-2 большинство молекул переходит в олигомеризованное состояние, что способствует образованию кластеров рецепторов [39].

Важную роль в CLEC-2-индуцированной сигнализации играют липидные рафты – микродомены в плазматической мембране, обогащённые холестеролом и сигнальными молекулами [40]. При активации липидные рафты могут “слипаться” друг с другом [40-42], а CLEC-2 и GP-VI перемещаются в эту область, однако механизм транслокации пока неизвестен. Предполагается, что благодаря высокой концентрации холестерола молекулы рецептора “застревают” в области рафта. Высокая локальная концентрация мессенджеров приводит к усилению общего сигнала [40, 42]. Тем не менее, остаётся неясным, насколько важны липидные рафты для первичной или для вторичной сигнализации, индуцированной CLEC-2 [43, 44].

Образования кластеров CLEC-2 по неизвестному механизму зависит от Syk- и SFK-киназ, при этом Syk-зависимым оказалось образование крупных кластеров, тогда как небольшие кластеры образовывались за счёт активности SFK [30]. Предполагается, что влияние Syk и SFK на кластеризацию CLEC-2 является косвенным. Подопланин также образует кластеры на поверхности клеток лимфатического эндотелия при связывании с CLEC-2 [17, 27, 30]. Неизвестно, что является первичным: кластеризация CLEC-2 или кластеризация подопланина.

Основными участниками CLEC-2-индуцированной сигнализации в тромбоцитах являются семейства тирозинкиназ Syk и SFK [45-47]. Механизмы активации и Syk, и SFK опираются на фосфорилирование по активационным сайтам, а также связывание с фосфотирозинами SH-2 или SH-3 доменов.

SFK представляют собой “градуированные переключатели”: в разных конформациях они проявляют разную активность. Изначально SFK находятся в автоингибированном фосфорилированном состоянии. При отщеплении ингибирующего фосфата под действием фосфатаз (CD148 или PTP1B) SFK-киназы переходят в полуактивное состояние [48, 49]. Затем они могут связаться SH-2 доменом с фосфорилированным остатком тирозина в цитоплазматическом сегменте CLEC-2 и увеличить свою активность. Наконец, SFK может дополнительно через SH-3 домен связать полипролин [50], что делает SFK полностью активными.

Syk-киназы являются переключателями типа “или”. Они могут быть активированы фосфорилированием тирозинового мотива в скрытом связывающем регионе (Y346). Данное фосфорилирование могут проводить SFK. С другой стороны, Syk могут связываться с фосфорилированными тирозинами hemITAM мотива двумя SH-2 доменами. Принципиально важным моментом является то, что оба SH-2 домена должны связаться с фосфотирозином. Связавшиеся Syk могут быть транс-автофосфорилированы или же фосфорилированы активными SFK, что переводит их в полностью активное состояние [50, 51].

Таким образом, можно утверждать, что в цитозоле тромбоцита изначально присутствуют активные участники сигнальных каскадов. Ведь в находящемся рядом с интактным эндотелием (покоящемся) тромбоците активны фосфатазы CD148, следовательно, SFK находятся в полуактивированном состоянии, и, в свою очередь, могут фосфорилировать Syk, приводя к их автоактивации [43] (рис. 3А).

Существует несколько моделей активации CLEC-2. Согласно первой, цитоплазматический домен CLEC-2 может быть фосфорилирован только Syk-киназами. Эта гипотеза была выдвинута на основе экспериментов с тромбоцитами мышей с выключенными генами двух из трёх основных белков семейства SFK. Фосфорилирование участников сигнального каскада CLEC-2 при этом нарушено не было. Аналогичные данные были получены и при нокауте CD148 [45]. С другой стороны, авторы не учитывали взаимозаменяемость киназ семейства SFK, а также роль тирозинфосфатазы PTP1B, которая могла заменить CD148 в ходе первичной активации SFK [48].

Согласно второй модели, CLEC-2 фосфорилируется только SFK. Известно, что при добавлении селективного ингибитора SFK 4-amino-5-(4-chloro-phenyl)-7-(dimethylethyl)pyrazolo-3,4-pyrimidine (PP2), фосфорилирование цитоплазматического домена CLEC-2 не происходит [13, 35]. Также было показано, что селективные ингибиторы Btk и PI3K (ибрутиниб и вортманнин соответственно) нарушают фосфорилирование Syk, не нарушая фосфорилирование CLEC-2. На основе этого была выдвинута гипотеза, состоящая в том, что активация Syk в сигнальном каскаде CLEC-2 зависит от Btk и PI3K, тогда как фосфорилирование CLEC-2 проводится только SFK [47] .

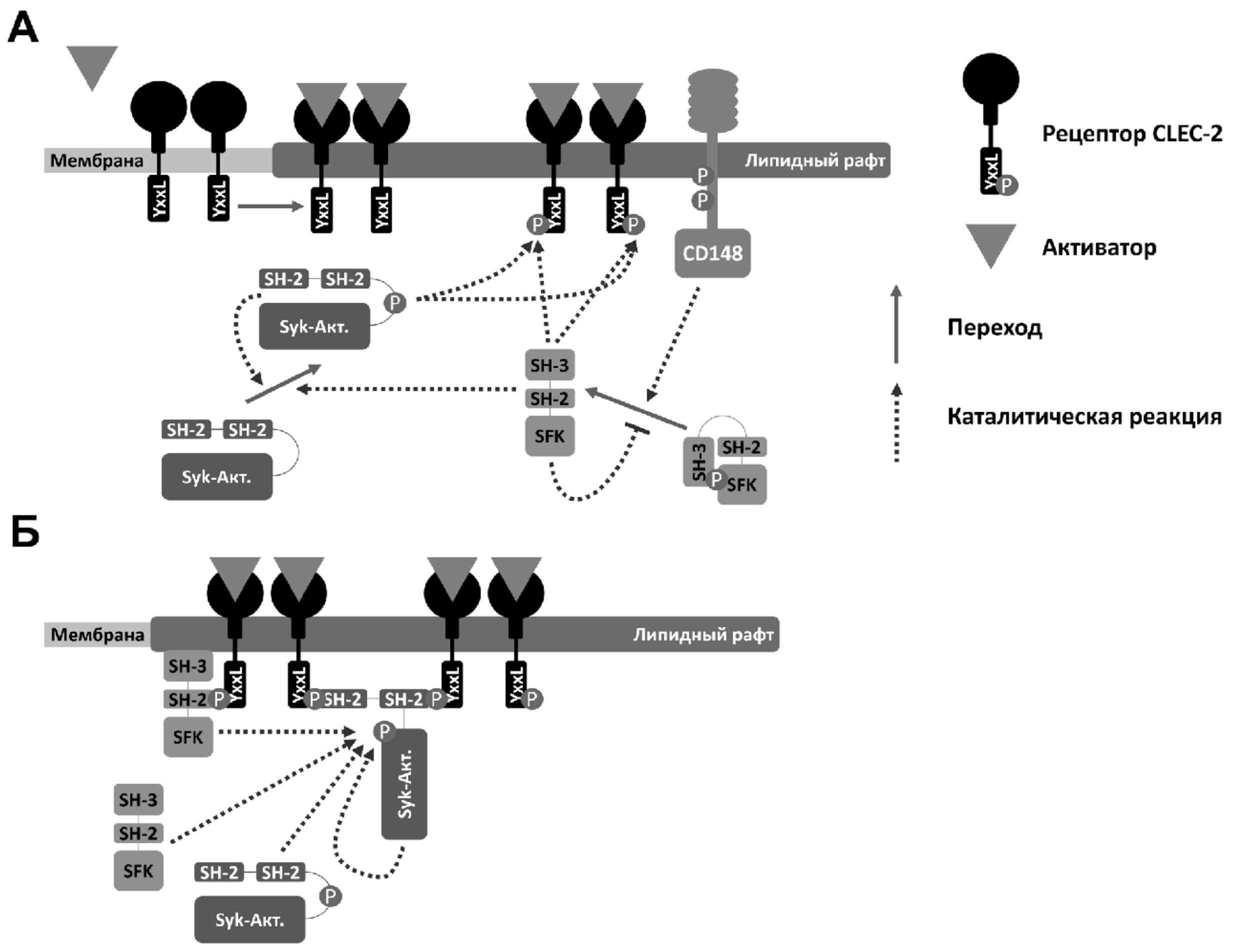

Рисунок 3. Последовательность сигнальных событий после активации тромбоцитов крови агонистами рецептора CLEC-2. **А** – в покоящемся состоянии в тромбоците активны фосфатазы CD148, которые дефосфорилируют SFK и переводят их из автоингибированного, в полуактивное состояние [48, 49, 64]. Затем SFK способны фосфорилировать покоящиеся Syk по Y346 в связывающем SH-2 домены и киназный домен регионе [13]. Автофосфорилирование Syk выступает в качестве положительной обратной связи. После связывания и транслокации CLEC-2 в липидные рафты, тирозин в цитоплазматическом домене CLEC-2 может быть фосфорилирован: активными Syk киназами [13, 45]; SFK [47, 65, 69]; совместно Syk и SFK [52]. **Б** – после того тирозин в цитоплазматическом домене CLEC-2 был фосфорилирован, к нему одним SH-2 доменом могут присоединяться SFK (становятся полностью активными [50]) и двумя доменами SH-2 – Syk. После этого Syk должны дополнительно быть фосфорилированы по тирозину 525/26 активными Syk, полуактивными и активными SFK или же автофосфорилированы. После этого Syk становятся полностью активными [50].

Согласно третьей модели активации, рецептор может быть фосфорилирован и Syk, и SFK. В пользу этой гипотезы выступает тот факт, что в присутствии селективных ингибиторов Syk (PRT318 [13], R406 [52]) фосфорилирование CLEC-2 после активации разными агонистами было нарушено. Аналогичные результаты были получены при модификации одного из SH-2 доменов Syk киназ, нарушавшей один из возможных путей активации Syk [13]. При построении компьютерной модели CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах нами также было показано, что только такой механизм позволяет описать существующие экспериментальные данные [53]. Все 3 модели активации CLEC-2 объединены на рисунке 3А.

После того, как внутриклеточные домены рецептора CLEC-2 становятся фосфорилированными, к ним присоединяются неактивные Syk и полуактивные SFK SH-2 доменами. Это приводит к полной активации данных тирозинкиназ и усиливает начальный сигнал (рис. 3Б).

Рассмотрим дальнейшую цепочку сигнальных событий. Активные Syk-киназы фосфорилируют адаптерный белок LAT, к которому своими SH-2 доменами присоединяются PI3K и PLCγ2 [54]. К фосфорилированным остаткам тирозина в цитоплазматическом домене LAT также присоединяются адаптерные белки BLNK, vav1/3, SLP-76. В случае дефицита этих молекул сигнализация от CLEC-2 значительно нарушается, однако, в отличие от дефицита Syk/SFK-киназ не прекращается полностью [55, 56]. *In vivo* показано, что дефицитные по SLP-76 тромбоциты не способны выполнять свои функции по защите стенок сосудов при воспалении [14]. PI3K становится полностью активной и превращает PIP_2 в PIP_3, который вносит вклад в рост рафта [57, 58]. К PIP_3 своим PH-доменом также присоединяется Btk. Таким образом, сигнальные белки оказываются сгруппированы в одной области [59]. К полипролину в аминокислотной последовательности Btk SH-3 доменом присоединяются SFK. Btk становятся полностью активными и через последовательность адаптерных белков, включающих BLNK, SLP-76, удерживающих PLCγ2 в “раскрытой” конформации, проводят активацию PLCγ2 [54, 60]. Положение Btk и PI3K в сигнальном каскаде CLEC-2 является спорным, однако участие в активации PLCγ2 продемонстрировано как для CLEC-2, так и для GP-VI [61]. Активная PLCγ2 гидролизует PIP_2, производя вторичные мессенджеры сигнализации IP_3 и DAG (рис. 4) [5]. IP_3 способствует выходу свободных ионов Ca^{2+} из ЭПР тромбоцитов, а DAG выступает в роли активатора нескольких изоформ PKC. PKC и Ca^{2+} активируют фактор обмена гуаниновых нуклеотидов CalDAG-GEFI, стимулирующий обмен GDP на GTP в активном центре малой растворимой GTPазы Rap1b. Это приводит к активации Rap1b, что, в свою очередь, способствует активации тромбоцитарных интегринов αIIbβ3, аффинность которых к фибриногену увеличивается. Другим функциональным ответом тромбоцитов на активацию кальциевой сигнализации является секреция содержимого плотных гранул (содержащих ADP, ATP, Ca^{2+}, серотонин) и α-гранул (содержащих IGF-1, PDGF, TGFβ, PF4, тромбоспондин, фибриноген, фибронектин и другие белки, участвующие в свёртывании крови), также регулируемая PKC. При α-дегрануляции тромбоцитов происходит выставление на их поверхность P-селектина [5, 62, 63].

Производимый активной PI3K PIP_3 приводит к активации серин/треониновой киназы Akt, осуществляющей фосфорилирование более 100 мишеней, включая GSK3α/β. Активные формы GSK3α/β являются отрицательными регуляторами активации тромбоцитов. Фосфорилирование GSK3α/β Akt приводит к инактивации GSK3α/β. Многократно было показано, что ингибирование активности GSK3α/β (такими ингибиторами как LiCl, SB216763) потенцирует активацию тромбоцитов [54]. При стимуляции агонистом CLEC-2 родоцитином также происходит потенциирование активации тромбоцитов. С другой стороны, ингибирование активации Akt PD0325901 приводило к значительному ингибированию агрегации тромбоцитов [60]. Влияние ингибиторов Akt может быть компенсировано ингибиторами GSK3α/β: последнее свидетельствует о том, что при активации CLEC-2 именно GSK3α/β является основной мишенью Akt [60].

Активация тромбоцитов через CLEC-2 зависит от вторичных медиаторов активации – ADP и TxA_2 [43]. В результате активации CLEC-2 и выхода ADP (в составе плотных гранул), а также TxA_2 (в результате активации COX-1) оказываются задействованы рецепторы TP (рецептор к TxA_2) и P_2Y_1 (пуринергический рецептор ADP) [3]. При стимуляции TP и P_2Y_1 оказываются задействованы Gq белки, которые передают сигнал на PKCα. В свою очередь, PKCα может активировать ряд фосфатаз, которые будут переводить SFK [48, 49, 64] в полуактивное состояние и таким образом усиливать активацию CLEC-2 [65]. Схема вторичной сигнализации при активации CLEC-2 и взаимосвязь первичной и вторичной сигнализаций от рецептора CLEC-2 приведены на рисунке 5.

3. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ УЧАСТНИКОВ СИГНАЛЬНОГО КАСКАДА CLEC-2 КАК МИШЕНЕЙ ДЛЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ

Так как роль CLEC-2 в развитии ряда заболеваний была достоверно продемонстрирована как *in vitro*, так и *in vivo*, активно ведётся разработка лекарственных препаратов, мишенью которых является данный тромбоцитарный рецептор или участники его сигнального каскада. Показана эффективность блокирующих антител к рецептору CLEC-2 тромбоцитов (клон 2CP) для предотвращения метастазирования меланом у мышей. Наибольшую эффективность 2CP проявил в комбинации с цитотоксическим препаратом цисплатином. Аналогично, эффективным оказалось антитело 2A2B10 [20, 21].

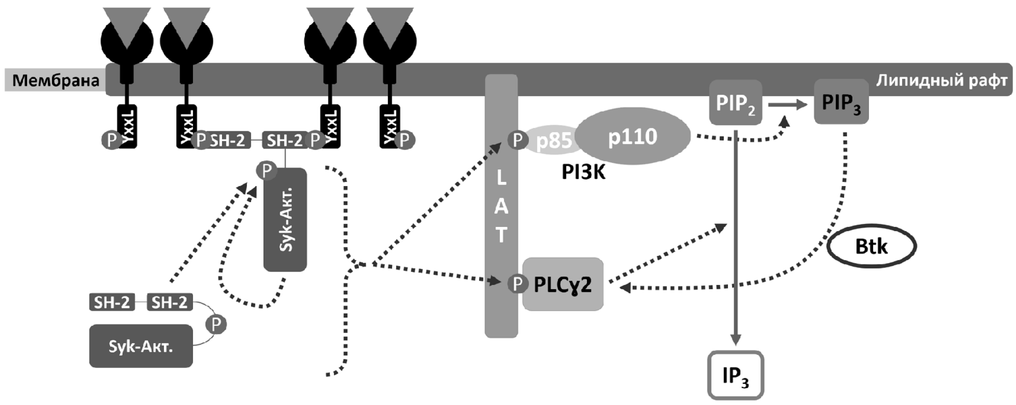

Рисунок 4. Сигнальный каскад CLEC-2 после активации Syk киназ. Активные Syk фосфорилируют белок-адаптер LAT. К нему присоединяются PLCγ2 и PI3K. PI3K производит PIP3 из PIP2. К PIP3 присоединяются Btk, что делает их активными. Btk активирует связанные с LAT PLCγ2, которые запускают производство IP_3 из PIP_2.

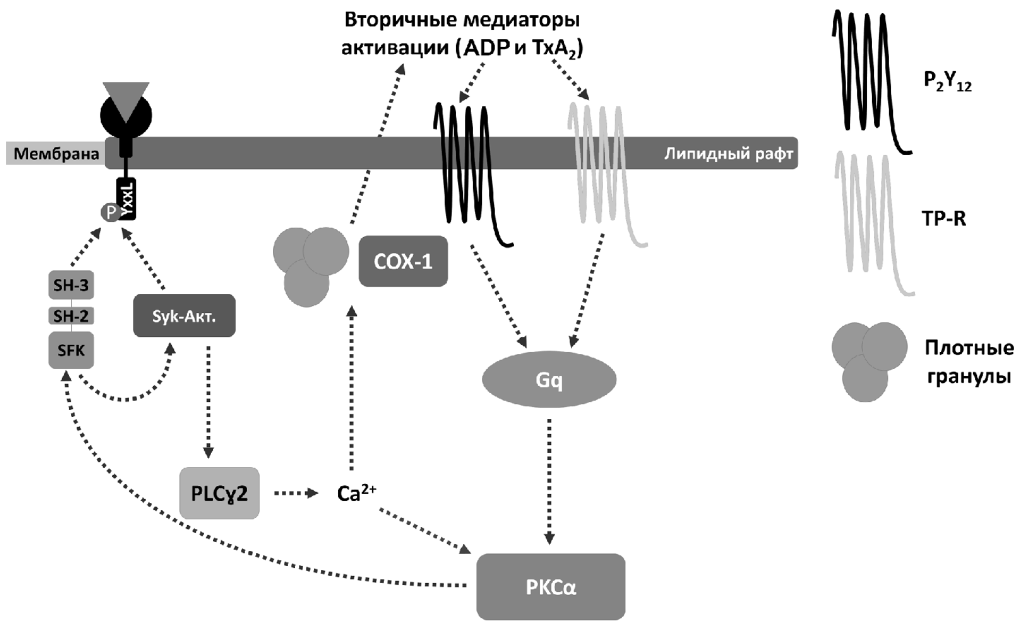

Рисунок 5. После запуска первичного сигнального каскада в результате выхода вторичных медиаторов активации тромбоцитов ADP и TxA_2 и лигирования соответствующих рецепторов, происходит активация PKCα, которая передаёт сигнал на SFK, многократно усиливая первичную активацию тромбоцитов.

Одним из перспективных соединений для терапии CLEC-2 зависимых заболеваний является ингибитор Syk-тирозинкиназ – фостаматиниб. Показано, что R406 – метаболит данного препарата, с высокой степенью эффективности предотвращает CLEC-2-индуцированную активацию тромбоцитов. Также важно заметить, что предотвращение активации CLEC-2 достигается при низких концентрациях R406. Таким образом, можно предположить, что при использовании низких дозировок фостаматиниба селективность воздействия препарата на тромбоцитарный CLEC-2 будет значительно выше [13, 66].

Наконец, в связи с тем, что агрегация тромбоцитов, индуцированная CLEC-2, зависит от вторичных медиаторов активации, можно использовать препараты, направленные на ингибирование вторичной сигнализации от ADP (клопидогрел, тикагрелор, тиклопедин) и TxA_2 (аспирин). Важно отметить, что влияние вторичных медиаторов активации будет значительно снижено при выполнении тромбоцитами задач по защите сосудистых стенок микрокапилляров при воспалениях [43, 44, 65].

Введение антител к тромбоцитарному рецептору CLEC-2 предотвращает развитие тромбозов глубоких вен при искусственном стенозе нижней полой вены у мышей [18]. Аналогично, при нарушении активации CLEC-2 не происходит развития дессиминированного внутрисосудистого свёртывания у мышей, которым вводили бактерии *Salmonella typhimurium* [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рецептор CLEC-2 тромбоцитов, наравне с элементами его сигнального каскада, является перспективной мишенью для антитромбоцитарной терапии при онкологических заболеваниях, тромбозах глубоких вен и сепсисе. Связывание эндогенных (подопланин, A100S13) или экзогенных (родоцитин, фукоидан) лигандов с рецептором CLEC-2 предположительно приводит к его концентрации в области липидных рафтов, способствующей активации. В цитоплазматическом домене связанного с лигандом CLEC-2 становится доступной для фосфорилирования по тирозину последовательность аминокислот YxxL, называемая hemiITAM. Это запускает передачу сигнала, благодаря активируемым тирозинкиназам Syk и SFK, которые ассоциируются с фосфорилированным остатком тирозина, что приводит к их полноценной активации. Активные тирозинкиназы фосфорилируют мембранный белок-адаптер LAT, с которым ассоциируется и таким образом активируется PLCγ2. PLCγ2 катализирует образование IP_3 и DAG – важных вторичных мессенджеров активации, приводящих к выходу ионов кальция из эндоплазматического ретикулума. Активация тромбоцитов лигандами CLEC-2 также зависит от секретируемых медиаторов вторичной активации – ADP (в составе плотных гранул) и TxA_2 (образующимся при участии COX-1).

С другой стороны, положение ряда белков в сигнальном каскаде неизвестно. Так, предполагается, что Btk и PI3K могут как приводить к активации Syk после активации SFK, так и участвовать в активации PLCγ2 [44]. Одним из используемых в настоящее время в терапии лейкозов препаратов, в качестве побочного действия влияющий на тромбоциты, является селективный ингибитор Btk/Tec киназ – ибрутиниб [67]. Для предотвращения побочного действия ибрутиниба на CLEC-2 индуцированную сигнализацию в тромбоцитах, для которой существенную роль играет Btk, исключительно важно уточнение положения Btk и PI3K в сигнальном каскаде CLEC-2.

Роли тромбоцитарного рецептора CLEC-2 продолжают уточняться. Однако уже сейчас во многих работах показана важность активации CLEC-2 его эндогенным лигандом подопланином для предотвращения смешения крови и лимфы у эмбрионов [12, 13, 68], а также для защиты стенок венул с высоким эндотелием при экстравазации лимфоцитов в случае воспалений [14].

В данном обзоре рассмотрены биохимические события, происходящие после связывания лиганда тромбоцитарного рецептора CLEC-2 и приводящие к дальнейшим функциональным ответам тромбоцитов. Приведены 3 модели, описывающие внутриклеточные события, происходящие после активации CLEC-2, а также разобраны дальнейшие события. Благодаря этому, возможно более точное предсказание терапевтических мишеней, среди которых возможно выделить сам рецептор CLEC-2, Syk-тирозинкиназы, Btk, а также вторичные медиаторы активации (ADP и TxA_2). Также освещены наиболее перспективные подходы к фармакологическому воздействию на CLEC-2 индуцированную активацию тромбоцитов в контексте онкологических заболеваний, тромбозов глубоких вен, сепсиса.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны профессору Е.В. Самочатовой (Национальный Медицинский Исследовательский Центр Детской Гематологии, Онкологии и Иммунологии им. Дмитрия Рогачёва), а также профессору S.P. Watson (Intitute of Cardiovascular Sciences and Cellular Pharmacology, Birmingham) за плодотворные обсуждения при выполнении данной работы. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 17-54-04009 и 17-00-00138), а также гранта Президента РФ для молодых ученых МД-229.2017.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гайтон А., Холл Дж.* (2008) Медицинская физиология, Логосфера, Москва (перевод с английского).
2 *Tuteja N.* (2009) Plant Signaling & Behavior, Landes Bioscience, **4**, 942-947.
3 *Kauskot A., Hoylaerts M.F.* (2012) Handbook of Experimental Pharmacology, Germany, pp. 23-57. DOI: 10.1007/978-3-642-29423-5_2.
4 *Шатурный В.И., Шахиджанов С.С., Свешникова А.Н., Пантелеев М.А.* (2014) Биомед. химия, **60**, 182-200. DOI: 10.18097/PBMC20146002182.
5 *Sveshnikova A.N., Balatskiy A.V., Demianova A.S., Shepelyuk T.O., Shakhidzhanov S.S., Balatskaya M.N., Pichugin A.V., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A.* (2016) J. Thromb. Haemost., **14**, 2045-2057. DOI: 10.1111/jth.13442.
6. *Watson S.P., Asazuma N., Atkinson B., Berlanga O., Best D., Bobe R., Jarvis G., Marshall S., Snell D., Stafford M., Tulasne D., Wilde J., Wonerow P., Frampton J.* (2001) Thrombosis and Haemostasis, **86**, 276-288.
7. *Abram C.L., Lowell C.A.* (2007) Science STKE, **2007**, re2 LP-re2. DOI: 10.1126/stke.3772007re2.
8. *Lee R.H., Bergmeier W.* (2016) J. Thromb. Haemost., **14**, 645-654. DOI: 10.1111/jth.13250.
9. *Plato A., Willment J.A., Brown GD.* (2013) Int. Rev. Immunol., **32**, 134-156. DOI: 10.3109/08830185.2013.777065.
10. *Suzuki-Inoue K., Kato Y., Inoue O., Mika K.K., Mishima K., Yatomi Y., Yamazaki Y., Narimatsu H., Ozaki Y.* (2007) J. Biol. Chem., **282**, 25993-26001. DOI: 10.1074/jbc.M702327200.
11. *Watson S.P., Herbert J.M.J., Pollitt A.Y.* (2010) J. Thromb. Haemost., **8**, 1456-1467. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.03875.x.
12. *Suzuki-Inoue K., Osada M., Ozaki Y.* (2017) J. Thromb. Haemost., **15**, 219-229. DOI: 10.1111/jth.13590.
13. *Hughes C.E., Finney B.A., Koentgen F., Lowe K.L., Watson S.P.* (2015) Blood, **125**, 144-155. DOI: 10.1182/blood-2014-05-579375.
14. *Boulaftali Y., Hess P.R., Getz T.M., Cholka A., Stolla M., Mackman N., Owens A.P., Ware J., Kahn M.L., Bergmeier W.* (2013) J. Clin. Invest., **123**, 908-916. DOI: 10.1172/JCI65154.
15. *Haining E.J., Cherpokova D., Wolf K., Becker I.C., Beck S., Eble J.A., Stegner D., Watson S.P., Nieswandt B.* (2017) Blood, **130**, 2224-2228. DOI: 10.1182/blood-2017-03-771907.
16. *Shirai T., Inoue O., Tamura S., Tsukiji N., Sasaki T., Endo H., Satoh K., Osada M., Sato-Uchida H., Fujii H., Ozaki Y., Suzuki-Inoue K.* (2017) J. Thromb. Haemost., **15**, 513-525. DOI: 10.1111/jth.13604.
17. *Astarita J.L., Acton S.E., Turley S.J.* (2012) Front. Immunol., **3**, 1-11. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00283.
18. *Payne H., Ponomaryov T., Watson S.P., Brill A.* (2016) Blood, **129**, 2013-2020. DOI: 10.1182/blood-2016-09-742999.
19. *Hitchcock J.R., Cook C.N., Bobat S., Ross E.A., Flores-Langarica A., Lowe K.L., Khan M., Coral Dominguez-Medina C., Lax S., Carvalho-Gaspar M., Hubscher S. et al.* (2015) J. Clin. Invest., **125**, 4429-4446. DOI: 10.1172/JCI79070.
20. *Takemoto A., Miyata K., Fujita N.* (2017) Cancer Metastasis Rev., **36**, 225-234. DOI: 10.1007/s10555-017-9672-2.
21. *Sekiguchi T., Takemoto A., Takagi S., Takatori K., Sato S., Takami M., Fujita N.* (2016) Oncotarget, **7**, 3934-3946. DOI: 10.18632/oncotarget.6598.
22 *Kato Y., Fujita N., Kunita A., Sato S., Kaneko M., Osawa M., Tsuruo T.* (2003) J. Biol. Chem., **278**, 51599-51605. DOI: 10.1074/jbc.M309935200.
23. *Kaneko M.K., Kato Y., Kitano T., Osawa M.* (2006) Gene, **378**, 52-57. DOI: 10.1016/j.gene.2006.04.023.
24. *Astarita J.L., Cremasco V., Fu J., Darnell M.C., Peck J.R., Nieves-Bonilla J.M., Song K., Kondo Y., Woodruff M.C., Gogineni A., Onder L., Ludewig B., Weimer R.M., Carroll M.C., Mooney D.J., Xia L., Turley S.J.* (2015) Nat. Immunol., **16**(1), 75-84. DOI: 10.1038/ni.3035.
25. *Martín-Villar E., Ferna B., Parsons M., Yurrita M.M., Megías D., Pérez-Gómez E., Jones G.E., Quintanilla M.* (2010) Mol. Biol. Cell, **21**, 4387-4399. DOI: 10.1091/mbc.E10-06-0489
26. *Acton S.E., Astarita J.L., Malhotra D., Lukacs-Kornek V., Franz B., Hess P.R., Jakus Z., Kuligowski M., Fletcher A.L., Elpek K.G. et al.* (2012) Immunity, Cell Press, **37**, 276-289. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.05.022.
27. *Suzuki-Inoue K., Osada M., Ozaki Y.* (2017) J. Thromb. Haemost., **15**, 219-229. DOI: 10.1111/jth.13590.
28. *Inoue O., Hokamura K., Shirai T., Osada M., Tsukiji N., Hatakeyama K., Umemura K., Asada Y., Suzuki-Inoue K., Ozaki Y.* (2015) PLoS ONE, **10**, 1-28. DOI: 10.1371/journal.pone.0139357.
29. *Imai F.L., Nagata K., Yonezawa N., Nakano M., Tanokura M.* (2008) Acta Crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications, **64**, 70-76. DOI: 10.1107/S1744309107068236.

30. *Pollitt A.Y., Poulter N.S., Gitz E., Navarro-Núñez L., Wang Y.J., Hughes C.E., Thomas S.G., Nieswandt B., Douglas M.R., Owen D.M., Jackson D.G., Dustin M.L., Watson S.P.* (2014) J. Biol. Chem., **289**, 35695-35710. DOI: 10.1074/jbc.M114.584284.
31. *Navarro-Núñez L., Pollitt A.Y., Lowe K., Latif A., Nash G.B., Watson S.P.* (2015) Thromb. Haemost., **113**(5), 1109-1120. DOI: 10.1160/TH14-09-0762.
32. *Watson A.A., Eble J.A., O'Callaghan C.A.* (2008) Protein Science, **17**, 1611-1616. DOI: 10.1110/ps.035568.108.
33 *Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Gerbst A.G., Ushakova N.A., Tsvetkova E.A., Dmitrenok A.S., Usov A.I., Nifantiev N.E.* (2016) Carbohydrate Polymers., **136**, 826-833. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.09.102.
34. *Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E., D'Incecco A., Piccoli A., Totani L., Tinari N., Morozevich G.E., Berman A.E., Bilan M.I. et al.* (2007) Glycobiology, **17**, 541-552. DOI: 10.1093/glycob/cwm014.
35. *Manne B.K., Getz T.M., Hughes C.E., Alshehri O., Dangelmaier C., Naik U.P., Watson S.P., Kunapuli S.P.* (2013) J. Biol. Chem., **288**, 7717-7726. DOI: 10.1074/jbc.M112.424473.
36. *Watson A.A., Christou C.M., James J.R., Fenton-May A.E., Moncayo G.E., Mistry A.R., Davis S.J., Gilbert R.J.C., Chakera A., O'Callaghan C.A.* (2009) Biochemistry, **48**, 10988-10996. DOI: 10.1021/bi901427d.
37. *Hughes C.E., Sinha U., Pandey A., Eble J.A., O'Callaghan C.A., Watson S.P.* (2013) J. Biol. Chem., **288**, 5127-5135. DOI: 10.1074/jbc.M112.411462.
38. *Hughes C.E., Navarro-Núñez L., Finney B.A., Mourão-Sá D., Pollitt A.Y., Watson S.P.* (2010) J. Thromb. Haemost., **8**, 2328-2332. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.04006.x.
39. *Hughes C.E., Pollitt A.Y., Mori J., Eble J.A., Tomlinson M.G., Hartwig J.H., O'Callaghan C.A., Fütterer K., Watson S.P.* (2010) Blood, **115**, 2947-2955. DOI: 10.1182/blood-2009-08-237834.
40. *Bodin S., Tronchure H., Payrastre B.* (2003) Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes, **1610**, 247-257. DOI: 10.1016/S0005-2736(03)00022-1.
41. *Locke D., Chen H., Liu Y., Liu C., Kahn M.L.* (2002) J. Biol. Chem., **277**, 18801-18809. DOI: 10.1074/jbc.M111520200.
42. *Pike L.J.* (2009) J. Lipid Res., **50**, S323-S328. DOI: 10.1194/jlr.R800040-JLR200.
43. *Pollitt A.Y., Grygielska B., Leblond B., Désiré L., Eble J.A., Watson S.P.* (2010) Blood, **115**, 2938-2946. DOI: 10.1182/blood-2009-12-257212.
44. *Manne B.K., Badolia R., Dangelmaier C.A., Kunapuli S.P.* (2015) Biochemical Pharmacology, Elsevier Inc., **93**, 163-170. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.11.005.
45. *Severin S., Pollitt A.Y., Navarro-Núñez L., Nash C.A., Mourão-Sá D., Eble J.A., Senis Y.A., Watson S.P.* (2011) J. Biol. Chem., **286**, 4107-4116. DOI: 10.1074/jbc.M110.167502
46. *Fuller G.L.J., Williams J.A.E., Tomlinson M.G., Eble J.A., Hanna S.L., Pöhlmann S., Suzuki-Inoue K., Ozaki Y., Watson S.P., Pearce A.C.* (2007) J. Biol. Chem., **282**, 12397-12409. DOI: 10.1074/jbc.M609558200.
47. *Manne B.K., Badolia R., Dangelmaier C., Eble J.A., Ellmeier W., Kahn M., Kunapuli S.P.* (2015) J. Biol. Chem., **290**, 11557-11568. DOI: 10.1074/jbc.M114.629527.
48. *Mori J., Wang Y.J., Ellison S., Heising S., Neel B.G., Tremblay M.L., Watson S.P., Senis Y.A.* (2012) Arterioscler. Thromb. Vascular Biol., **32**, 2956-2965. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300447.
49. *Senis Y.A., Tomlinson M.G., Ellison S., Mazharian A., Lim J., Zhao Y., Kornerup K.N., Auger J.M., Thomas S.G, Dhanjal T., Kalia N., Zhu J.W., Weiss A., Watson S.P.* (2009) Blood, **113**, 4942-4954. DOI: 10.1182/blood-2008-08-174318.
50. *Bradshaw J.M.* (2010) Cellular Signalling, Elsevier Inc., **22**, 1175-1184. DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.03.001.
51. *Tsang E., Giannetti A.M., Shaw D., Dinh M., Tse J.K.Y., Gandhi S., Ho A., Wang S., Papp E., Bradshaw J.M.* (2008) J. Biol. Chem., **283**, 32650-32659. DOI: 10.1074/jbc.M806340200.
52. *Spalton J.C., Mori J., Pollitt A.Y., Hughes C.E., Eble J.A., Watson S.P.* (2009) J. Thromb. Haemost., **7**, 1192-1199. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03451.x.
53. *Martyanov A.A., Balabin F.A., Dunster J.L., Panteleev M.A., Gibbins J.M., Sveshnikova A.N.* [in press] Biochim. Biophys. Acta - General Subject.
54. *Moroi A.J., Watson S.P.* (2015) Biochem. Pharmacol., **94**, 186-194. DOI: 10.1016/j.bcp.2015.02.004.
55. *Fuller G.L.J., Williams J.A.E., Tomlinson M.G., Eble J.A., Hanna S.L., Pöhlmann S., Suzuki-Inoue K., Ozaki Y., Watson S.P., Pearce A.C.* (2007) J. Biol. Chem., **282**, 12397-12409. DOI: 10.1074/jbc.M609558200.
56. *Eble J.A., Po S., Inoue O., Gartner T.K., Hughan S.C., Pearce A.C., Laing G.D., Theakston R.D.G., Schweighoffer E., Zitzmann N., Morita T., Tybulewicz V.L.J., Ozaki Y., Watson S.P.* (2016) Blood, **107**, 542-550.
57. *Scheid M.P., Marignani P.A., Woodgett J.R.* (2002) Mol. Cell. Biol., **22**, 6247-6260. DOI: 10.1128/MCB.22.17.6247.
58. *Wang J., Richards D.A.* (2012) Biology Open, **1**, 857-862. DOI: 10.1242/bio.20122071.
59. *Hyvönen M., Saraste M.* (1997) EMBO J., **16**, 3396 LP-3404.
60. *Moroi A.J., Watson S.P.* (2015) J. Thromb. Haemost., **13**, 1139-1150. DOI: 10.1111/jth.12954.
61. *Gibbins J.M., Briddon S., Shutes A., Van Vugt M.J., Van De Winkel J.G.J., Saito T., Watson S.P.* (1998) J. Biol. Chem., **273**, 34437-34443. DOI: 10.1074/jbc.273.51.34437.
62. *Cook A.A., Deng W., Ren J., Li R., Sondek J., Bergmeier W.* (2018) J. Biol. Chem., **293,** 8521. DOI: 10.1074/jbc.RA118.002712.
63. *Ma Y.Q., Qin J., Plow E.F.* (2007) J. Thromb. Haemost., **5**, 1345-1352. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2007.02537.x.
64. *Musumeci L., Kuijpers M.J., Gilio K., Hego A., Théâtre E., Maurissen L., Vandereyken M., Diogo C.V., Lecut C., Guilmain W. et al.* (2015) Circulation, **131**, 656-668. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010186.
65. *Badolia R., Inamdar V., Manne B.K., Dangelmaier C., Eble J.A., Kunapuli S.P.* (2017) J. Biol. Chem., **292**, 14516-14531. DOI: 10.1074/jbc.M117.791012.
66. *Geahlen R.L.* (2015) Trends Pharmacol. Sci., **35**, 414-422. DOI: 10.1016/j.tips.2014.05.007.Getting.
67. *Akinleye A., Chen Y., Mukhi N., Song Y., Liu D.* (2013) J. Hematol. Oncol., BioMed Central, **6**, 59. DOI: 10.1186/1756-8722-6-59.
68. *Ozaki Y., Tamura S., Suzuki-Inoue K.* (2016) Thrombosis J., **14**, 27. DOI: 10.1186/s12959-016-0099-8.
69. *Mukherjee S., Zhu J., Zikherman J., Parameswaran R., Kadlecek T.A., Wang Q., Au-Yeung B., Ploegh H., Kuriyan J., Das J., Weiss A.* (2013). Science Signaling, **6**, ra1 LP-ra1. http://stke.sciencemag.org/content/6/256/ra1.abstract.

Поступила: 07. 08. 2018.
Принята к печати: 01. 10. 2018.

CLEC-2 INDUCED SIGNALLING IN BLOOD PLATELETS

A.A. Martyanov[1,2]*, V.N. Kaneva[1,3], M.A. Panteleev[2,3], A.N. Sveshnikova[1,2]

[1]Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University,
1/2 Leninskie gory, Moscow, 119991 Russia; *e-mail: aa.martyanov@physics.msu.ru
[2]Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow, 119991 Russia
[3]Rogachev National Scientific and Practical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology,
Moscow, 117198 Russia

Platelet activating receptor CLEC-2 has been identified on platelet surface a decade ago. The only confirmed endogenous CLEC-2 agonist is podoplanin. Podoplanin is a transmembrane protein expressed by lymphatic endothelial cells, reticular fibroblastic cells in lymph nodes, kidney podocytes and by cells of certain tumors. CLEC-2 and podoplanin are involved in the processes of embryonic development (blood-lymph vessel separation and angiogenesis), maintaining of vascular integrity of small vessels during inflammation and prevention of blood-lymphatic mixing in high endothelial venules. However, CLEC-2 and podoplanin are contributing to tumor methastasis progression, *Salmonella* sepsis, deep-vein thrombosis. CLEC-2 signalling cascade includes tyrosine-kinases (Syk, SFK, Btk) as well as adapter LAT and phospholipase Cγ2, which induces calcium signalling. CLEC-2, podoplanin and proteins, participating in CLEC-2 signalling cascade, are perspective targets for antithrombotic therapy.

Key words: platelet; CLEC-2 receptor; tyrosine kinases; lymphangiogenesis; methastasis; podoplanin