

Определение роли перестройки цитоскелета в процессе кластеризации тромбоцитарных рецепторов к коллагену методами агентного моделирования

Determining the role of cytoskeletal reorganization in clustering of platelet receptors (GPVI) to collagen using agent-based modeling

А.Е. Болдова^{1,2}, Д.Ю. Нечипуренко^{1,2,3}, М.А. Пантелеев^{1,2,3}, А.Н. Свешникова^{1,2,3#}.
A. E. Boldova^{1,2}, D. Yu. Nechipurenko^{1,2,3}, M.A. Panteleev^{1,2,3}, A. N. Sveshnikova^{1,2,3#}.

1. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Россия, 109029, г. Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30
2. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Россия, 117997, г. Москва, ул. Саморы Машела, д. 1
3. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, 119991, г. Москва, Ленинские Горы, д. 1, корп. 2

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

1. Center for Theoretical Problems of Physico-chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, 30 Srednyaya Kalitnikovskaya st., Moscow, 109029, Russia
2. Dmitry Rogachev National Medical Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, 1 Samory Mashela st., Moscow, 117997, Russia
3. Lomonosov Moscow State University, 1/2 Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia

Получено: 28.08.2024

Принято к публикации: 24.09.2024

Опубликовано: 30.12.2024

EDN: KJFYAJ

Аннотация

Передача внешнего стимула внутрь клетки обычно осуществляется за счет работы клеточных рецепторов. Можно выделить целый класс рецепторов, для которых одним из важнейших этапов передачи сигнала является кластеризация. В качестве основных индукторов кластеризации чаще всего рассматривают либо их связывание с общим лигандом, либо изменение аффинности друг к другу. Регуляция процесса кластеризации мембранных рецепторов происходит за счет целого ряда факторов, зависящих как от молекулы активатора (например, его структура и валентность), так и от микроокружения рецепторов в мембране клетки (вязкость и текучесть локального участка мембранны, определяемая липидным составом). Однако, недавно стало известно, что возможно существование еще одного фактора микроокружения, влияющего на процесс кластеризации, а именно: локальной перестройки цитоскелета клетки при активации рецепторов. Данный процесс приводит к увеличению подвижности молекул в ограниченной области, в результате чего возможно значительное повышение вероятности столкновения с другими рецепторами и их последующей активации.

В настоящей работе была разработана компьютерная модель активации тромбоцитарных рецепторов GPVI от коллагена подобного пептида,

учитывающая липидное микроокружение и способность активированного рецептора инициировать перестройку цитоскелета.

С помощью данной модели была проведена оценка роли локальной перестройки цитоскелета в покое и при активации. Было показано, что количество кластеризованных рецепторов как в состоянии покоя, так и при активации максимально в том случае, когда изменения цитоскелета (и скорости диффузии, соответственно) носят локальный характер. При постоянных значениях скорости диффузии (как минимально, так и максимально возможных), кластеризация наблюдается для меньшего числа рецепторов.

Таким образом, в данной работе было показано, что локальная перестройка цитоскелета играет одну из важных ролей в процессе кластеризации и активации целого класса мембранных рецепторов.

Работа поддержана грантом РНФ 23-44-00082.

Ключевые слова: Агентное моделирование, Кластеризация, Рецепторы, кортикальный цитоскелет.

Annotation

The process of transmitting external stimuli into the cell is typically achieved through the activity of cellular receptors. A significant number of receptors

are capable of clustering, which represents a crucial step in the transmission of signals. The clustering of receptors could be triggered by the binding of a common ligand or a change in receptor affinity. The regulation of membrane receptor clustering depends on multiple factors related both to the activating molecule (such as its structure and valency) and the local membrane environment around the receptors (e.g., the viscosity and fluidity of the membrane area, determined by its lipid composition). It has recently been demonstrated that an additional environmental factor may exert an influence on clustering, namely the local reorganization of the cell's cytoskeleton upon receptor activation. This process increases the mobility of molecules within a restricted area, thereby significantly raising the likelihood of receptor collisions and subsequent activation.

In this study, a computational model was developed to investigate the activation of platelet GPVI receptors by a collagen-like peptide, taking into account the lipid microenvironment and the ability of the receptor to induce cytoskeletal reorganisation upon activation. The model was employed to evaluate the role of local cytoskeletal reorganization in both resting and activated states. The findings indicated that the greatest number of clustered receptors, both in resting and activated states, was observed when cytoskeletal alterations (and, consequently, diffusion rates) were localised. When the diffusion rates were maintained at a constant level, irrespective of whether they were at their minimum or maximum values, the clustering of receptors was observed to occur for a smaller number of receptors.

The findings of this study illustrate that local cytoskeletal reorganization plays an important role in the clustering and activation of platelet GPVI receptors.

The work was supported by the RSF 23-44-00082.

Key words: Agent-based modeling, Clustering, Receptors, Cortical cytoskeleton.

Введение

Одной из часто встречающихся задач математической биологии является моделирование агрегации (кластеризации, полимеризации) белков и других биомолекул [1]. Классическим подходом для решения такой задачи является система уравнений Смолуховского, основанная на законе действующих масс. Данная система позволяет описать временную динамику концентрации агрегатов различного размера [2]. Формирование агрегатов определяется двумя основными процессами: слипанием агрегатов меньшего размера, а также распадом до более мелких агрегатов [2]. В общем виде данный

процесс может быть описан в виде следующей реакции: $A_i + A_j \leftrightarrow A_{(i+j)}$ при $i, j \geq 1$, где символами $A_i, A_j, A_{(i+j)}$ обозначена концентрация агрегатов размера i, j и $i+j$ соответственно [1]. Данной системе реакций соответствует следующая система обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ):

$$\begin{cases} \frac{dA_i}{dt} = -k_{ij}A_iA_j + k_{i+j}A_{i+j} \\ \frac{dA_j}{dt} = -k_{ij}A_iA_j + k_{i+j}A_{i+j} \\ \frac{dA_{i+j}}{dt} = k_{ij}A_iA_j - k_{i+j}A_{i+j} \end{cases}$$

где k_{ij} – константа скорости «слипания» агрегатов размеров i и j , k_{i+j} – константа скорости разделения большого агрегата на два размерами i и j .

Ограничением такого моделирования, помимо длительности расчетов, является отсутствие достоверное информации о распределении агрегатов по размеру в реальной биологической системе, из-за чего невозможно однозначного определить параметры модели по экспериментальным данным. Для решения первой проблемы ранее была предложена упрощенная схема Смолуховского, при которой сложная мультипарметрическая система уравнений сводится к системе, состоящей из двух ОДУ. Переменными в данном случае будут выступать концентрации отдельных частиц и кластеров, содержащих больше одной частицы. В основе данного подхода лежит предположение о различиях в скоростях ассоциации/диссоциации агрегатов между собой и между агрегатом и отдельной частицей [1]. Данная схема действительно позволяет существенно сократить времена вычислений и количество варьируемых параметров, однако в то же время она дает возможность получить только общую информацию о системе (например, средний размер агрегата и количество одиночных частиц) [1].

Однако для моделирования начальных этапов кластеризации рецепторов описанный выше метод неприменим. В клеточной биологии процессы олигомеризации рецепторов являются ключевыми для множества задач [3]. Особое значение имеет кластеризация рецепторов, ассоциированных с тирозинкиназами – ферментами, которые катализируют фосфорилирование, то есть присоединение фосфатной группы к аминокислотным остаткам тирозина в белках-мишениях [4]. За счет данной модификации значительным образом могут измениться функциональные особенности белков. Она играет огромное значение поскольку управляет активацией, например, иммунных клеток – лимфоцитов [5,6] и нейтрофилов [7,8]. В тромбоцитах – клетках, отвечающих за мониторинг целостности сосудистого русла – одним из таких

рецепторов является гликопротеин VI (GPVI) [9,10]. Данный receptor принадлежит к классу трансмембранных белков, пронизывающих клеточную мембрану. Внеклеточная часть receptorа содержит довольно крупные участки – домены, благодаря которым receptor может определять наличие активатора во внешнем пространстве. В процессе кластеризации запускается каскад реакций фосфорилирования и образования большого белкового комплекса, называемого сигналосомой. В результате тромбоцит может перейти в активированное состояние: происходит изменение формы, секреция гранул, изменение активности поверхностных белков [10,11].

Одним из основных лигандов GPVI является коллаген [12]. Связывание receptorа с коллагеном обусловлено наличием в последнем повторяющейся аминокислотной последовательности глицин-пролин-гидроксипролин (GPO) [13]. Интересно, что аффинность мономеров и димеров GPVI к коллагену может различаться более чем в 100 раз [12,14,15]. В процессе активации количество димеров GPVI возрастает [14], в результате чего тромбоцит способен связывать больше молекул коллагена. За счет данного механизма возможна реализация положительной обратной связи [12]. Помимо коллагена существует ряд других лигандов GPVI – как естественного происхождения (фибрин [16–19], ламинин [20], адипонектин [21], конвульксин [22,23]), так и синтетических (например, коллаген-подобный пептид – CRP [13,24]), – которые индуцируют кластеризацию и активацию GPVI.

Существенным фактором, влияющим на кластеризацию белков в распределенных системах, является скорость их диффузии [3,25]. Для трансмембранных receptorов данный параметр определяется свойствами локального микроокружения [26]. Многие receptorы, ассоциированные с тирозинкиназами (например, receptor семействаlectиноподобных типов C-CLEC-2, receptor B-клеток – BCR, receptor T-клеток – TCR) располагаются в так называемых липидных raftах. Липидные raftы представляют собой ограниченные области мембраны, обогащенные липидами определённого состава, такими как холестерин и насыщенные глицерофосфолипиды [27–32]. Благодаря присутствию в составе raftа холестерола средняя площадь, приходящаяся на отдельную молекулу липида, уменьшается [33,34]. Таким образом, обеспечивается более высокая плотность упаковки молекул липидов в пределах одного raftа [33,34]. Соответственно, при попадании в липидный raft способность белков к диффузии может значительно снижаться, что способствует стабилизации образованных белковых кластеров. Receptorы GPVI

также принадлежат классу receptorов, ассоциированных с тирозин-киназами, и располагаются преимущественно в области липидных raftов [27,35–37].

Еще одним фактором, влияющим на диффузию белков в мембране, является примембранный цитоскелет (кортекс) – сеть актиновых filamentов, формирующая структурный каркас под плазматической мембраной [38]. Толщина кортикального цитоскелета составляет от 50 нм до 400 нм [39,40], а размер ячеек, образуемых актиновыми нитями, составляет 20–200 нм [40]. filamentы служат «барьерами», препятствующими движению трансмембранных белков [41,42]. При активации клетки запускаются процессы полимеризации и деполимеризации актина, что приводит к изменению размера ячеек сети [43]. Частным случаем такой реорганизации является локальная перестройка цитоскелета, индуцированная связыванием лиганда с тирозинкиназным receptorом [44–46]. Можно предположить, что активация отдельного receptorа вызывает локальную перестройку цитоскелета, приводящую к локальному ускорению диффузии, и тем самым способствует кластеризации соседних receptorов. В результате можно ожидать усиление активации клетки и дальнейшую перестройку цитоскелета. Однако, экспериментальная проверка данной гипотезы является крайне сложной задачей. В настоящей работе мы применяем метод агентного моделирования, которое позволяет воспроизвести диффузию и кластеризацию receptorов (на примере GPVI) в сочетании с динамической реорганизацией примембранного кортекса в ответ на активацию клетки.

Материалы и Методы

В данной работе представлена пространственная компьютерная модель динамики диффузии, кластеризации и фосфорилирования GPVI, созданная с использованием метода агентного моделирования (AM). AM представляет собой один из методов имитационного моделирования [47]. В основе AM лежит предположение о том, что система моделируется как совокупность автономных объектов, называемых агентами [48,49]. Каждому агенту присваивается набор характеристик и правил, определяющих как его внутреннее состояние, так и взаимодействие с другими агентами и окружающей средой [47].

Для моделирования был выбран регион плазматической мембраны тромбоцита размером $0.6 \times 0.6 \text{ мкм}^2$ (что составляет приблизительно 2 % от общей поверхности покоящегося тромбоцита). Моделируемый участок состоял из

2 несмешивающихся частей: липидных рафтов и окружающую их мембрану. В роли агентов были выбраны липидные рафты и отдельные рецепторы GPVI. Липидные рафты были представлены в виде круглых областей, чьи радиусы лежат в диапазоне от 4 до 100 нм [50]. В качестве основных параметров для липидных рафтов задавались координаты центров и радиусы. В случае сближения двух рафтов на расстояние, меньшее суммы их радиусов, происходило их слияние в единый raft. В данном случае образовавшийся raft инициализировался как новый объект, координаты центра и радиус которого рассчитывались по формулам:

$$\begin{pmatrix} x_0 \\ y_0 \end{pmatrix} = \frac{R_1^2}{R_1^2 + R_2^2} \begin{pmatrix} x_1 \\ y_1 \end{pmatrix} + \frac{R_2^2}{R_1^2 + R_2^2} \begin{pmatrix} x_2 \\ y_2 \end{pmatrix}, \quad (1)$$

$$R = \sqrt{R_1^2 + R_2^2} \quad (2)$$

где $(x_0, y_0), (x_1, y_1)$ и (x_2, y_2) - координаты центров объединенного и двух исходных рафтов; R , R_1 и R_2 -радиусы объединенного и двух исходных рафтов.

В качестве основных параметров для отдельных рецепторов задавались координаты центров, радиусы и состояние (активированное или неактивированное). В рамках модели было принято допущение, что молекулы GPVI могут находиться исключительно в липидных рафтах. Каждый рецептор моделировался как жесткий (недеформируемый) круглый объект радиусом 25 нм [13] и мог находиться в одном из двух состояний: неактивированном (деfosфорилированном) и активированном (fosфорилированном) (рис.1). Если расстояние между двумя рецепторами не превышало удвоенного радиуса, считалось, что они образуют кластер. Кластеризация могла происходить как в результате случайных столкновений рецепторов в мембране, так и за счет механического стягивания, осуществляемого молекулами активатора с фиксированным расстоянием между сайтами связывания. Находясь в кластере, неактивированный GPVI мог перейти в активированное состояние с вероятностью P_{act} . Данный параметр определялся несколькими факторами: концентрацией активирующих Src-киназ в заданной области [51], а также их константой диссоциации с рецептором [3]. Поскольку Src-киназы располагаются преимущественно в области липидных рафтов [36], в модели предполагалось, что их количество пропорционально площади отдельного rafta. Таким образом, вероятность активации i -го рецептора описывалась следующим уравнением:

$$P_{act}[i] = P_0 * \frac{\pi * R_i^2}{S_{Lo}}, \quad (3)$$

где P_0 – вероятность активации

кластеризованного рецептора, R - радиус липидного rafta, в котором находился i -рецептор, S_{Lo} -площадь липидных рафтов. Площадь липидных рафтов составляла 35 % [52,53] от площади мембранны и для моделируемого участка равна 0.126 мкм². Предполагается, что деактивация рецептора может происходить случайным образом с вероятностью P_{deact} .

В начальный момент времени все липидные рафты можно было разделить на 2 категории: свободные липидные рафты, не содержащие рецепторов, а также связанные рафты, принадлежавшие отдельным рецепторам. Радиусы связанных липидных рафтов равны 25 нм. Количество свободных липидных рафтов вычислялось по следующей формуле:

$$N_{free} = \left[\frac{S_{Lo} - GPVI_0 * \pi * R_{bound}^2}{\pi * \left(\frac{R_{min} + R_{max}}{2} \right)^2} \right], \quad (4)$$

где S_{Lo} - площадь, занимаемая липидными рафтами, $GPVI_0$ - количество рецепторов GPVI на моделируемом участке мембранны, R_{bound} - радиус связанного липидного rafta в начальный момент времени, R_{min} , R_{max} – минимальный и максимальный радиусы свободных липидных рафтов в начальный момент времени соответственно.

В начальный момент времени координаты рецепторов GPVI задавались случайным образом. Связанные липидные рафты позиционировались так, чтобы их центры совпадали с координатами соответствующих рецепторов. Координаты центров остальных липидных рафтов распределяются в свободном пространстве. Радиусы свободных липидных рафтов выбирались также случайно в соответствии с нормальным распределением и лежали в диапазоне от 4 нм до 100 нм. При инициализации модели происходило объединение перекрывающихся липидных рафтов с образованием единого rafta. Центр и радиус образованного rafta вычислялись по формулам (1-2).

В основе модели лежало предположение о том, что движение объектов (отдельных молекул GPVI и липидных рафтов) можно рассматривать как броуновское и, следовательно, описывать с помощью формулы Эйнштейна-Смолуховского. Таким образом, смещение r центра отдельной частицы в двумерном пространстве описывалось следующим уравнением:

$$r = \sqrt{4D\Delta t}, \quad (5)$$

где D -коэффициент диффузии объекта (рафтов или отдельных рецепторов GPVI), Δt – шаг времени.

Положение элементов модели вычислялось итеративно на основе их координат на предыдущем временном шаге. Координаты

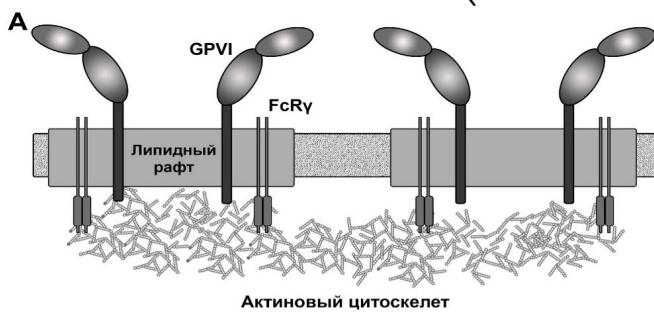
центра каждого рецептора GPVI определялись относительно центра липидного рафта, в котором тот был локализован.

Для обеспечения строгой локализации рецепторов в пределах своих мембранных доменов были заданы граничные условия. Если в результате расчёта новое положение молекулы GPVI оказывалось за пределами её рафта (т.е. расстояние от центра рецептора до центра рафта превышало его радиус), то направление её смещения изменялось на противоположное. При этом величина смещения сохранялась, что физически соответствует упругому отражению от границы домена.

В рамках модели предполагалось, что коэффициент диффузии рецепторов определялся относительной плотностью цитоскелета в месте их расположения. Коэффициент диффузии липидного рафта был обратно пропорционален натуральному логарифму его радиуса и также зависел от плотности актинового цитоскелета [41,54].

В построенной модели актиновый цитоскелет был задан неявным образом как фактор μ , влияющий на коэффициент диффузии рецепторов и липидных рафтов. Фактор μ обратно пропорционален относительной плотности цитоскелета в выбранной точке. Предполагалось, что в покоящемся состоянии в области неактивированных одиночных рецепторов $\mu_0=0.001$. Также считалось, активация рецептора запускает процесс «таяния» (снижение плотности) цитоскелета, который описывался нормальным распределением. Фактор μ в каждый момент времени представлял собой сумму сигналов от всех активных источников, однако не мог превышать максимальное значение $\mu_{max}=1$. В общем виде данная величина в момент времени t произвольной точке с координатами (x, y) мембранны задавалась следующим уравнением:

$$\mu(x, y, t) = \min \left(\mu_{max}, \mu_0 + \sum_i \frac{\nu \Delta t}{\sqrt{4 \pi \delta \tau_i}} * e^{-\frac{(x-x_i)^2 + (y-y_i)^2}{4 \delta \tau_i}} \right), \quad (6)$$



где ν -эффективность «таяния» цитоскелета определяет максимальный сигнал от отдельного источника, x_i, y_i - координаты i -го источника сигнала, δ -скорость распространения сигнала «таяния» цитоскелета, τ_i -время, прошедшее после активации i -го источника сигнала. Через время τ_d уровень сигнала, распространяемого от отдельного источника, становился меньше μ_0 , соответственно, его вкладом можно было пренебречь.

Коэффициенты диффузии GPVI при различных плотностях актинового цитоскелета, распределения размеров липидных рафтов рецепторов были получены из литературы. Неизвестные параметры были подобраны на основе доступных экспериментальных данных [55]. Параметры модели приведены в Таблице 1.

Модель была разработана в языке программирования Python, с использованием стандартных общедоступных библиотек питону, scipy, pandas.

Статистический анализ проводился посредством программного обеспечения GraphPad Prism v9.5.1 (Калифорния, США).

Результаты

Сопоставление результатов работы модели и существующих экспериментальных данных.

В рамках данной модели предполагалось, что активирующие молекулы не влияют на вероятность активации рецепторов напрямую, но способствуют их кластеризации. Соответственно, ключевыми параметрами активатора, регулирующими результат работы модели, являлись: концентрация, валентность (максимальное число связывающих рецепторов), а также наименьшее расстояние между ближайшими сайтами связывания.

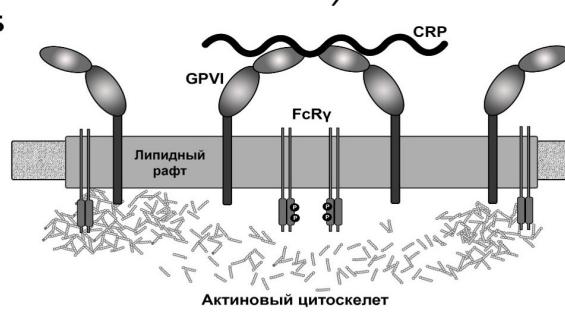


Рисунок 1. Схема модели состояния мембраны тромбоцита в покое (А) и при активации (Б). В покоящемся состоянии диффузия отдельных рецепторов GPVI ограничена плотной сетью актинового цитоскелета. Молекула активатора (в данном случае, CRP) индуцирует физическое стягивание отдельных рецепторов друг к другу. При кластеризации GPVI может перейти в активированное состояние (то есть происходит фосфорилирование ITAM-мотивов, сопряженных с FcRy-цепями рецепторов). Активация рецептора запускает цепь событий, в результате которых происходит изменение микроокружения (в том числе, изменяется липидный состав мембраны, окружающей рецептор). Данный процесс инициирует локальную деполимеризацию актинового цитоскелета, что вызывает увеличение коэффициента диффузии GPVI.

Обозначение	Параметр	Значение	Источник
Δt	Шаг времени	0.005 с	Данная работа
S_{tot}	Площадь полной поверхности мембраны тромбоцита	18 мкм ²	Оценено на основе [56]
θ	Доля моделируемого участка мембранны	0.02	Данная работа
θ_{lo}	Доля, занимаемая липидными рафтами, от общей площади мембранны	0.35	Оценено на основе [52,53]
S_0	Площадь моделируемого участка мембранны	0.36 мкм ²	Оценено на основе [56]
S_{Lo}	Площадь, занимаемая липидными рафтами моделируемого участка мембранны	0.126 мкм ²	Оценено на основе [52,53,56]
R_{\min}	Минимальный радиус свободного липидного рафта в начальный момент времени	4 нм	Оценено на основе [50]
R_{\max}	Максимальный радиус свободного липидного рафта в начальный момент времени	100 нм	Оценено на основе [50]
R_{bound}	Радиус связанного липидного рафта в начальный момент времени	25 нм	Оценено на основе [13]
$GPVI_{\text{tot}}$	Среднее количество рецепторов GPVI, приходящееся на 1 тромбоцит	9600	Оценено на основе [51]
$GPVI_0$	Количество рецепторов GPVI на моделируемом участке мембранны	192	Оценено на основе [51,56]
P_0	Вероятность активации кластеризованного рецептора	0.5	Данная работа
P_{deact}	Вероятность деактивации рецептора	0.5	Данная работа
μ_0	Степень «таяния» цитоскелета в области не активированных одиночных рецепторов	0.001	Данная работа
μ_{\max}	Максимальная степень «таяния» цитоскелета	1	Данная работа
v	Эффективность «таяния» цитоскелета	0.05 мкм/с	Данная работа
r_{GPVI}	Радиус рецептора GPVI	25 нм	Оценено на основе [13]
δ	Скорость распространения сигнала «таяния» цитоскелета	0.05 мкм ² /с	Данная работа
τ_d	Время деактивации источника «таяния» цитоскелета	0.35 с	Данная работа
D_{lo}	Коэффициент диффузии липидного рафта радиусом 25 нм	0.02 мкм ² /с	
D_{BCR}	Коэффициент диффузии молекулы GPVI	0.021 мкм ² /с	Оценено на основе [57]

Таблица 1. Параметры модели.

Действие активатора в модели было задано следующим образом: при инициализации часть рецепторов GPVI случайным образом оказывалась жестко связанный внутри единого липидного рафта, причем расстояние между центрами рецепторов соответствовало расстоянию между сайтами связывания активатора. После запуска модели, эти рецепторы могли свободно диффундировать и вращаться с коэффициентом диффузии, обратно пропорциональным размеру кластера.

В качестве активатора GPVI был рассмотрен CRP. Данный пептид способен связывать вместе до 5 рецепторов, причем расстояние между двумя ближайшими сайтами не превышало удвоенного радиуса отдельного рецептора GPVI [13]. Таким образом, благодаря 1 молекуле CRP 5 рецепторов

могли быть объединены в единый кластер. В модели принималось, что связывание рецепторов и молекулы CRP являлось необратимым.

Состояния мембраны в различных условиях представлены на рис. 2А, Б. В результате расчетов было показано, что при активации 5 мкг/мл CRP доля кластеризованных рецепторов была статистически значимо ($p<0.05$) выше, чем в стационарном состоянии (рис. 2Г). Кроме того, была произведена оценка степени «таяния» цитоскелета (представляющая собой интегральное значение коэффициента μ) при различных условиях (рис. 2В). Как можно видеть из гистограмм распределения (рис. 2В), степень «таяния» при активации была значительно выше, чем в покоящемся состоянии клетки.

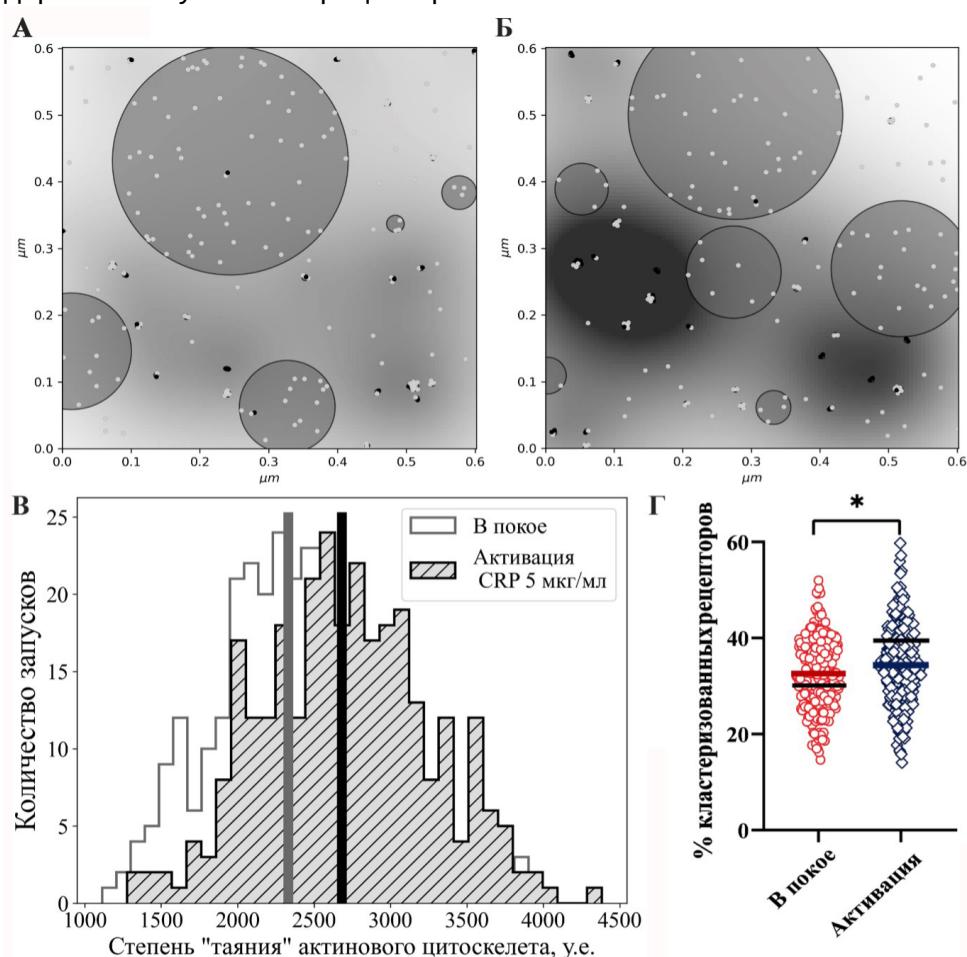


Рисунок 2. Результат работы модели в условиях покоя и активации. Типичное состояние мембраны в покоящемся состоянии (А) и в результате активации 5 мкг/мл CRP (Б). Рецепторы в неактивированном состоянии обозначены светло-серыми точками, активированном – черными. Липидные рафты представлены в виде серых круглых областей с выделенной границей. Области с высоким значением коэффициента μ (и низкой плотностью цитоскелета, соответственно), представлены в виде темных участков на мембране. Области, где коэффициент μ минимален (а плотность цитоскелета максимальна) представлены белым цветом. Чем больше коэффициент μ в определенной точке, тем темнее данная точка. (В) Распределение степени «таяния» актинового цитоскелета на моделируемом участке мембранны на 100 с после запуска для покоящегося состояния (обозначено серым контуром) и при активации 5 мкг/мл CRP (обозначено серым цветом с черными штриховыми линиями). Общее количество запусков для каждого из моделируемых условий – 240. Вертикальные серая и черная линии обозначают средние значения степени «таяния» в состоянии покоя и при активации соответственно. (Г) Сравнение предсказаний модели и экспериментальных данных [55] доли кластеризованных рецепторов в покое (результат отдельного запуска представлен красным кольцом, среднее значение по всем запускам обозначено красной горизонтальной чертой) и при активации 5 мкг/мл CRP (результат отдельного запуска представлен синим ромбом, среднее значение по всем запускам обозначено синей горизонтальной чертой) через 100 с после запуска. Экспериментальные данные представлены черными горизонтальными чертами для разных экспериментальных условий. Общее количество запусков для каждого из моделируемых условий – 240. Оценка статистической значимости производилась по t-критерию Стьюдента (* соответствуют $p\text{-value} < 0.05$).

Оценка влияния цитоскелета.

Для определения роли цитоскелета в поддержании состояния покоя и инициации активации были рассмотрены следующие ситуации: (1) степень «таяния» цитоскелета регулировалась сигналом от активированного рецептора; (2) актиновый цитоскелет не препятствовал движению, что соответствовало максимальному коэффициенту диффузии в каждой точке мембранны (в данном случае степень «таяния» принимала наибольшее значение μ_{\max}); (3) динамика актинового цитоскелета не зависела от активации отдельных рецепторов, что соответствовало минимальному значению коэффициента диффузии в каждой точке мембранны (степень «таяния» цитоскелета принимала наименьшее значение, равное μ_0). Результаты вычислений представлены на рис.3.

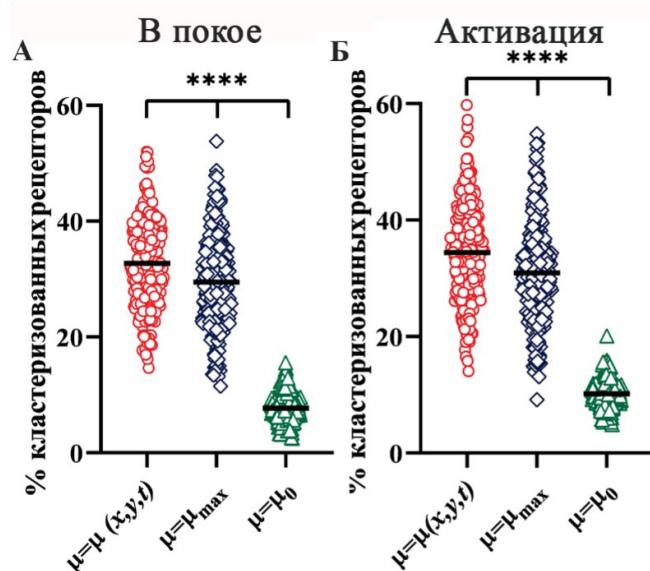


Рисунок 3. Оценка роли «таяния» цитоскелета для поддержания состояния покоя и в процессе активации 5 мкг/мл CRP. Доля кластеризованных рецепторов в состоянии покоя (А) и при активации (Б) при следующих условиях: коэффициент μ зависит от координаты, времени и описывается формулой (4) (результат отдельного запуска представлен красным кольцом); влияние цитоскелета на диффузию отдельных рецепторов минимально - коэффициент μ достигает максимального значения $\mu = \mu_{\max}$ (результат отдельного запуска представлен синим ромбом); «таяние» цитоскелета отсутствует - коэффициент μ не превышает минимального значения $\mu = \mu_0$ (результат отдельного запуска представлен зеленым треугольником). Общее количество запусков для каждого из моделируемых условий – 240. Результат рассматривался на 100 с после запуска модели. Оценка статистической значимости производилась по критерию Краскела-Уоллиса (*** соответствуют $p\text{-value} < 0.0001$).

Было установлено, что при максимальной степени «таяния» ($\mu = \mu_{\max}$) доля кластеризованных рецепторов (обозначены синими ромбами) была статистически значимо меньше как в состоянии покоя, так и при активации 5 мкг/мл CRP по сравнению со случаем, когда μ мог изменяться в зависимости от активации и кластеризации (обозначены красными кругами).

Для минимальной степени «таяния» ($\mu = \mu_0$), как и ожидалось, доля кластеризованных рецепторов (обозначены зелеными треугольниками) была также существенно ниже, чем в случае изменяющейся μ .

Обсуждение и заключение

В настоящей работе была впервые разработана агентная компьютерная модель кластеризации рецепторов GPVI тромбоцита, учитывающая динамику цитоскелета в процессе активации. Данная модель позволяет оценить не только распределение кластеров рецепторов GPVI в различные моменты времени после активации, но и исследовать влияние перестроек цитоскелета на процессы активации и олигомеризации. За основу модели была принята одна из гипотез, предложенная для описания кластеризации и активации другого рецептора, запускающего тирозинкиназную сигнализацию, - рецептора В-клеток (BCR) [43,58,59]. Согласно литературным данным в покоящихся В-клетках диффузия BCR ограничена актиновым цитоскелетом, причем скорость диффузии обратно пропорциональна плотности актинового цитоскелета, расположенного под мембраной [58,60].

В первую очередь, с помощью построенной модели была оценена доля кластеризованных рецепторов. Особый интерес представляют результаты, полученные для состояния покоя. С помощью модели было показано, что более 30% рецепторов GPVI находятся в кластерах даже при отсутствии активатора. Этот результат согласуется с известным экспериментальным данным для GPVI [55]. Явление кластеризации рецепторов, ассоциированных с тирозинкиназами, при отсутствии активации характерно не только для тромбоцитов. Ярким примером служит BCR. С помощью высокочувствительных методов было показано, что в состоянии покоя на поверхности В-клеток доля мономеров не превышает 60% от общего количества рецепторов [61]. Добавление активаторов (например, CRP к тромбоцитам или поливалентных фрагментов антител против BCR к В-клеткам) вызывало значительное увеличение доли димеров и олигомеров соответствующих рецепторов на поверхности клеток [55,61]. Эти экспериментальные наблюдения были успешно подтверждены с помощью разработанной модели.

Построенная модель позволяет проверить гипотезу о роли цитоскелета на начальных этапах активации тромбоцита через receptor GPVI. С помощью модели было показано, что доля кластеризованных рецепторов при постоянной плотности цитоскелета значительно ниже, чем при возможной локальной деполимеризации.

Более того, было обнаружено, что при полной деполимеризации цитоскелета (степень «таяния» принимает максимальное значение во всех точках мембраны) доля кластеризованных рецепторов статистически значимо снижается по сравнению с ситуацией, когда степень «таяния» зависит от активации. На первый взгляд, данный результат может показаться неочевидным. При максимальной деполимеризации актинового цитоскелета коэффициент диффузии принимает наибольшее значение, что позволяет отдельным рецепторам двигаться быстрее и чаще сталкиваться. Однако отсутствие ограничений также приводит к увеличению расстояния, на которое рецепторы могут удаляться друг от друга между столкновениями. В случае локального изменения степени «таяния» цитоскелета (и, соответственно, коэффициента диффузии), рецепторы способны двигаться быстро и часто сталкиваться только в небольшой ограниченной области. Это предотвращает их значительное рассеивание. Доказательством нашего вывода могут служить работы [15,62], где экспериментально было показано, что добавление ингибиторов полимеризации актина приводит к снижению количества димеризованных рецепторов.

К настоящему времени опубликован ряд работ, посвященных активации и кластеризации рецепторов GPVI [1,56,63–67]. Большинство из них [1,64–67] основаны на решении системы ОДУ. Такие модели позволяют исследовать общий ответ клетки на действие активаторов и проанализировать отдельные этапы внутриклеточной сигнализации. Однако с их помощью невозможно получить данные о пространственном распределении рецепторов на поверхности мембранны или оценить влияние процессов, имеющих локальный характер. Альтернативным подходом является агентное моделирование. Данный метод был применен в работах [56,63] для исследования димеризации тромбоцитарных рецепторов, ассоциированных с тирозин киназами (а именно, CLEC-2 и GPVI). Авторы исследовали влияние таких параметров, как относительный коэффициент диффузии внутри и вне рафтов, размер рафтов, содержание дополнительных белков в компартментах. В отличие от нашей работы, в указанных исследованиях влияние цитоскелета не рассматривалось. Процесс активации моделировался путем изменения константы ассоциации мономеров, что не позволяет непосредственно оценить, как различные дозы активатора и его валентность влияют на процесс кластеризации. Тем не менее, выводы нашей работы частично согласуются с результатами работы [56], где показано, что доля кластеризованных рецепторов

возрастает, если рецепторы способны свободно двигаться только в ограниченной области.

Большинство существующих работ, посвященных моделированию взаимодействия цитоскелета и мембранны, в первую очередь направлены на то, чтобы предсказать изменения физических свойств мембранны в целом. Подобные модели позволяют рассчитать поверхностное натяжение мембранны, создаваемое примембранным кортексом [68], скорость роста фило- и ламеллоподий [69–72]. Отдельно следует отметить работы [73,74], в которых описаны экспериментальные данные о распределении липидов и формировании липидных рафтов при наличии статичного кортекса под мембранны. Однако, в данных работах не рассматриваются движение и кластеризация мембранных белков.

Построенная нами модель обладает рядом ограничений. Во-первых, в данной модели не реализован механизм разделения больших липидных рафтов на малые при достижении ими критического размера. Во-вторых, модель основана на допущении о том, что рецепторы GPVI могут находиться исключительно в липидных рафтах. В-третьих, в данной работе был рассмотрен упрощенный механизм активации рецепторов GPVI, зависящий только от заякоренных в мембранны белков, но не учитывающий работу цитозольных ферментов, локализующихся на мембранны в процессе активации.

В результате работы нами была разработана агентная компьютерная модель, позволившая определить роль локальной перестройки примембранного цитоскелета в процессе кластеризации и активации целого класса мембранных рецепторов.

Финансирование

Данная работа поддержана грантом Российского научного фонда 23-44-00082

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Список используемых сокращений

GPVI – гликопротеин 6 (glycoprotein VI)

CRP – коллаген-подобный пептид (collagen-related peptide)

CLEC-2 - рецептор семейства лектиноподобных типа С (C-type lectin-like)

BCR – В-клеточный рецептор (B-cell receptor)

CRP – коллаген-подобный пептид (collagen-related peptide)

СН – гомологичный кальпонину (calponin)

homology)

PIP_s – полифосфоинозитиды
(polyphosphoinositides)

Список литературы

- Garzon Dasgupta AK, Martyanov AA, Filkova AA, Panteleev MA, Sveshnikova AN. Development of a Simple Kinetic Mathematical Model of Aggregation of Particles or Clustering of Receptors. *Life* 2020;10:97. <https://doi.org/10.3390/life10060097>.
- Лешаков О.Э., Логинов В.М. Коагуляция частиц в стохастической среде. Сибирский журнал индустриальной математики 2000:159–71.
- Martyanov AA, Balabin FA, Dunster JL, Panteleev MA, Gibbins JM, Sveshnikova AN. Control of Platelet CLEC-2-Mediated Activation by Receptor Clustering and Tyrosine Ki-nase Signaling. *Biophys J* 2020;118:2641–55. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.04.023>.
- Lee MJ, Yaffe MB. Protein Regulation in Signal Transduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016;8:a005918. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005918>.
- Ketchum C, Miller H, Song W, Upadhyaya A. Ligand Mobility Regulates B Cell Receptor Clustering and Signaling Activation. *Biophysical Journal* 2014;106:26–36. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.10.043>.
- Veneziano R, Moyer TJ, Stone MB, Wamhoff E-C, Read BJ, Mukherjee S, et al. Role of nanoscale antigen organization on B-cell activation probed using DNA origami. *Nat Nanotech-nol* 2020;15:716–23. <https://doi.org/10.1038/s41565-020-0719-0>.
- Bouti P, Webbers SDS, Fagerholm SC, Alon R, Moser M, Matlung HL, et al. $\beta 2$ Integrin Signaling Cascade in Neutrophils: More Than a Single Function. *Front Immunol* 2020;11:619925. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.619925>.
- Langereis JD. Neutrophil integrin affinity regulation in adhesion, migration, and bacterial clearance. *Cell Adh Migr* 2013;7:476–81. <https://doi.org/10.4161/cam.27293>.
- Свешникова АН., Степанян МГ, Пантелеев МА. Функциональные ответы тромбоцитов и внутриклеточная сигнализация: молекулярные связи. Часть 1: ответы н.д. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202101014>.
- Степанян МГ, Филькова АА, Гарсон Дасгупта АК, Мартьянов АА, Свешникова АН. Активация тромбоцитов через receptor GPVI: вариабельность ответа. *Биол мембрany* 2020;37:442–52. <https://doi.org/10.31857/S0233475520060079>.
- Olivier V, Syvannarath V, Gros A, Butt A, Loyau S, Jandrot-Perrus M, et al. Collagen can selectively trigger a platelet secretory phenotype via glycoprotein VI. *PLoS One* 2014;9:e104712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104712>.
- Clark JC, Neagoe RAI, Zuidzcherwoude M, Kavanagh DM, Slater A, Martin EM, et al. Evidence that GPVI is Expressed as a Mixture of Monomers and Dimers, and that the D2 Do-domain is not Essential for GPVI Activation. *Thromb Haemost* 2021;121:1435–47. <https://doi.org/10.1055/a-1401-5014>.
- Feitsma LJ, Brondijk HC, Jarvis GE, Hagemans D, Bihan D, Jerah N, et al. Structural in-sights into collagen binding by platelet receptor glycoprotein VI. *Blood* 2022;139:3087–98. <https://doi.org/10.1182/blood.2021013614>.
- Jung SM, Tsuji K, Moroi M. Glycoprotein (GP) VI dimer as a major collagen-binding site of native platelets: direct evidence obtained with dimeric GPVI-specific Fabs. *J Thromb Haemost* 2009;7:1347–55. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03496.x>.
- Poulter NS, Pollitt AY, Owen DM, Gardiner EE, Andrews RK, Shimizu H, et al. Clustering of glycoprotein VI (GPVI) dimers upon adhesion to collagen as a mechanism to regulate GPVI signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 2017;15:549–64. <https://doi.org/10.1111/jth.13613>.
- Alshehri OM, Hughes CE, Montague S, Watson SK, Frampton J, Bender M, et al. Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets. *Blood* 2015;126:1601–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-641654>.
- Mangin PH, Gardiner EE, Ariëns RAS, Jandrot-Perrus M. Glycoprotein VI interplay with fibrin(ogen) in thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2023;21:1703–13. <https://doi.org/10.1016/j.jtha.2023.03.022>.
- Mammadova-Bach E, Ollivier V, Loyau S, Schaff M, Dumont B, Favier R, et al. Platelet gly-coprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. *Blood* 2015;126:683–91. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-629717>.
- Mangin PH, Onselaer M-B, Receveur N, Le Lay N, Hardy AT, Wilson C, et al. Immobilized fibrinogen activates human platelets through glycoprotein VI. *Haematologica* 2018;103:898–907. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.182972>.
- Inoue O, Suzuki-Inoue K, McCarty OJT, Moroi M, Ruggeri ZM, Kunicki TJ, et al. Laminin stimulates spreading of platelets through integrin $\alpha 6\beta 1$ -dependent activation of GPVI. *Blood* 2006;107:1405–12. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2406>.
- Riba R, Hughes CE, Graham A, Watson SP, Naseem KM. Globular adiponectin induces platelet activation through the collagen receptor GPVI-Fc receptor gamma chain complex. *J Thromb Haemost* 2008;6:1012–20. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.02982.x>.
- Jandrot-Perrus M, Lagrue AH, Okuma M, Bon C. Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin alpha2beta1. *J Biol Chem* 1997;272:27035–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.43.27035>.
- Horii K, Brooks MT, Herr AB. Convulxin forms a dimer in solution and can bind eight copies of glycoprotein VI: implications for platelet activation. *Biochemistry* 2009;48:2907–14. <https://doi.org/10.1021/bi082530x>

- org/10.1021/bi801820q.
24. Sang Y, Huskens D, Wichapong K, de Laat B, Nicolaes GAF, Roest M. A Synthetic Triple Helical Collagen Peptide as a New Agonist for Flow Cytometric Measurement of GPVI-Specific Platelet Activation. *Thromb Haemost* 2019;119:2005–13. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1697660>.
 25. Lier M van, Verhoef S, Cauwenberghs S, Heemskerk JWM, Akkerman J-WN, Heijnen HFG. Role of membrane cholesterol in platelet calcium signalling in response to VWF and collagen under stasis and flow. *Thromb Haemost* 2008;99:1068–78. <https://doi.org/10.1160/TH07-08-0528>.
 26. Goswami D, Gowrishankar K, Bilgrami S, Ghosh S, Raghupathy R, Chadda R, et al. Nanoclusters of GPI-anchored proteins are formed by cortical actin-driven activity. *Cell* 2008;135:1085–97. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.032>.
 27. Izquierdo I, Barrachina MN, Hermida-Nogueira L, Casas V, Eble JA, Carrascal M, et al. Platelet membrane lipid rafts protein composition varies following GPVI and CLEC-2 receptors activation. *J Proteomics* 2019;195:88–97. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.01.014>.
 28. Мартынов АА, Канева ВН, Пантелеев МА, Свешникова АН. CLEC-2-индуцированная внутриклеточная сигнализация в тромбоцитах крови. *Биомед химия* 2018;64:387–96. <https://doi.org/10.18097/PBMC20186405387>.
 29. Мартынов АА, Канева ВН, Пантелеев МА, Свешникова АН. Физиологические и пато-физиологические аспекты активации тромбоцитов крови через рецептор CLEC-2. *Онко-гематология* 2018;13:83–90. <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2018-13-3-83-90>.
 30. Stone MB, Shelby SA, Núñez MF, Wisser K, Veatch SL. Protein sorting by lipid phase-like domains supports emergent signaling function in B lymphocyte plasma membranes. *eLife* 2017;6:e19891. <https://doi.org/10.7554/eLife.19891>.
 31. Gupta N, DeFranco AL. Lipid rafts and B cell signaling. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2007;18:616–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.07.009>.
 32. Jury EC, Flores-Borja F, Kabouridis PS. Lipid rafts in T cell signalling and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2007;18:608–15. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.08.002>.
 33. Falck E, Patra M, Karttunen M, Hyvönen MT, Vattulainen I. Lessons of slicing membranes: interplay of packing, free area, and lateral diffusion in phospholipid/cholesterol bilayers. *Biophys J* 2004;87:1076–91. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.041368>.
 34. Боздагян МЕ, Шайтан КВ. Исследование структуры рафтов биологических мембран методами компьютерного моделирования. *Клиническая Практика* 2016;66–72.
 35. Quinter PG, Dangelmaier CA, Quinton TM, Kunapuli SP, Daniel JL. Glycoprotein VI agonists have distinct dependences on the lipid raft environment. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2007;5:362–8. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02309.x>.
 36. Locke D, Chen H, Liu Y, Liu C, Kahn ML. Lipid Rafts Orchestrate Signaling by the Platelet Receptor Glycoprotein VI*. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277:18801–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111520200>.
 37. Bodin S, Tronchère H, Payrastre B. Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2003;1610:247–57. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00022-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00022-1).
 38. Bovellan M, Romeo Y, Biro M, Boden A, Chugh P, Yonis A, et al. Cellular control of corti-cal actin nucleation. *Curr Biol* 2014;24:1628–35. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.069>.
 39. Kelkar M, Bohec P, Charras G. Mechanics of the cellular actin cortex: From signalling to shape change. *Current Opinion in Cell Biology* 2020;66:69–78. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.05.008>.
 40. Svitkina TM. Actin Cell Cortex: Structure and Molecular Organization. *Trends Cell Biol* 2020;30:556–65. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.03.005>.
 41. Treanor B, Depoil D, Gonzalez-Granja A, Barral P, Weber M, Dushek O, et al. The Mem-brane Skeleton Controls Diffusion Dynamics and Signaling through the B Cell Receptor. *Immunity* 2010;32:187–99. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.12.005>.
 42. Jaqaman K, Grinstein S. Regulation from within: the cytoskeleton in transmembrane signaling. *Trends Cell Biol* 2012;22:515–26. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.07.006>.
 43. Li J, Yin W, Jing Y, Kang D, Yang L, Cheng J, et al. The Coordination Between B Cell Receptor Signaling and the Actin Cytoskeleton During B Cell Activation. *Front Immunol* 2019;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03096>.
 44. Jaumouillé V, Farkash Y, Jaqaman K, Das R, Lowell CA, Grinstein S. Actin Cytoskeleton Reorganization by Syk Regulates Fcγ Receptor Responsiveness by Increasing Its Lateral Mobility and Clustering. *Developmental Cell* 2014;29:534–46. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.04.031>.
 45. Shi W, Ye B, Rame M, Wang Y, Cioca D, Reibel S, et al. The receptor tyrosine kinase EPHB6 regulates catecholamine exocytosis in adrenal gland chromaffin cells. *J Biol Chem* 2020;295:7653–68. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013251>.
 46. Papakonstanti EA, Stournaras C. Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Letters* 2008;582:2120–7. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.02.064>.
 47. Стеряков АА. Об одном универсальном методе построения моделей для сложных многоагентных систем. *Компьютерные Исследования и Моделирование* 2013;5:513–23.
 48. Bonabeau E. Agent-based modeling: Methods and techniques for simulating human systems.

- Proceedings of the National Academy of Sciences 2002;99:7280–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.082080899>.
49. ElKalaawy N, Wassal A. Methodologies for the modeling and simulation of biochemical networks, illustrated for signal transduction pathways: A primer. *Biosystems* 2015;129:1–18. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2015.01.008>.
 50. Deventer S van, Arp AB, Spriel AB van. Dynamic Plasma Membrane Organization: A Complex Symphony. *Trends in Cell Biology* 2021;31:119–29. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.11.004>.
 51. Burkhardt JM, Vaudel M, Gambaryan S, Radau S, Walter U, Martens L, et al. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* 2012;120:e73-82. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-416594>.
 52. Prior IA, Muncke C, Parton RG, Hancock JF. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol* 2003;160:165–70. <https://doi.org/10.1083/jcb.200209091>.
 53. Ceñido JF, Itin B, Stark RE, Huang Y, Oquendo MA, John Mann J, et al. Characterization of lipid rafts in human platelets using nuclear magnetic resonance: A pilot study. *Biochem Biophys Rep* 2017;10:132–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.005>.
 54. Saffman PG, Delbrück M. Brownian motion in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:3111–3. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.8.3111>.
 55. Jung SM, Moroi M, Soejima K, Nakagaki T, Miura Y, Berndt MC, et al. Constitutive Dimerization of Glycoprotein VI (GPVI) in Resting Platelets Is Essential for Binding to Collagen and Activation in Flowing Blood. *J Biol Chem* 2012;287:30000–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.359125>.
 56. Tantiwong C, Dunster JL, Cavill R, Tomlinson MG, Wierling C, Heemskerk JWM, et al. An agent-based approach for modelling and simulation of glycoprotein VI receptor diffusion, localisation and dimerisation in platelet lipid rafts. *Sci Rep* 2023;13:3906. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30884-6>.
 57. Haining EJ, Matthews AL, Noy PJ, Romanska HM, Harris HJ, Pike J, et al. Tetraspanin Tspan9 regulates platelet collagen receptor GPVI lateral diffusion and activation. *Platelets* 2017;28:629–42. <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1254175>.
 58. Treanor B, Depoil D, Bruckbauer A, Batista FD. Dynamic cortical actin remodeling by ERM proteins controls BCR microcluster organization and integrity. *The Journal of Experimental Medicine* 2011;208:1055. <https://doi.org/10.1084/jem.20101125>.
 59. Mattila PK, Batista FD, Treanor B. Dynamics of the actin cytoskeleton mediates receptor cross talk: An emerging concept in tuning receptor signaling. *J Cell Biol* 2016;212:267–80. <https://doi.org/10.1083/jcb.201504137>.
 60. Tolar P. Cytoskeletal control of B cell responses to antigens. *Nat Rev Immunol* 2017;17:621–34. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.67>.
 61. Gomes de Castro MA, Wildhagen H, Sograte-Idrissi S, Hitzing C, Binder M, Trepel M, et al. Differential organization of tonic and chronic B cell antigen receptors in the plasma membrane. *Nature Communications* 2019;10:820. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08677-1>.
 62. Jaqaman K, Kuwata H, Touret N, Collins R, Trimble WS, Danuser G, et al. Cytoskeletal control of CD36 diffusion promotes its receptor and signaling function. *Cell* 2011;146:593–606. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.049>.
 63. Maqsood Z, Clark JC, Martin EM, Cheung YFH, Morán LA, Watson SET, et al. Experimental validation of computerised models of clustering of platelet glycoprotein receptors that signal via tandem SH2 domain proteins. *PLoS Comput Biol* 2022;18:e1010708. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010708>.
 64. Dunster JL, Mazet F, Fry MJ, Gibbins JM, Tindall MJ. Regulation of Early Steps of GPVI Signal Transduction by Phosphatases: A Systems Biology Approach. *PLOS Computational Biology* 2015;11:e1004589. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004589>.
 65. Dunster JL, Unsworth AJ, Bye AP, Haining EJ, Sowa MA, Di Y, et al. Interspecies differences in protein expression do not impact the spatiotemporal regulation of glycoprotein VI mediated activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2020;18:485–96. <https://doi.org/10.1111/jth.14673>.
 66. Stepanyan MG, Filkova AA, Garzon Dasgupta AK, Martyanov AA, Sveshnikova AN. Platelet Activation through GPVI Receptor: Variability of the Response. *Biochem Moscow Suppl Ser A* 2021;15:73–81. <https://doi.org/10.1134/S1990747820050074>.
 67. Martyanov AA, A MA, Stepanyan MG, Г CM, Sveshnikova AN, H CA. Theoretical Explanation for the Variability in Platelet Activation through the GPVI Receptor. *Biologičeskie membrany* 2023;40:112–21. <https://doi.org/10.31857/S0233475523020044>.
 68. Chugh P, Clark AG, Smith MB, Cassani DAD, Dierkes K, Ragab A, et al. Actin cortex architecture regulates cell surface tension. *Nat Cell Biol* 2017;19:689–97. <https://doi.org/10.1038/ncb3525>.
 69. Korobkin J, Proenza Garcia A, Sveshnikova A. A minimal mathematical model of neutrophil pseudopodium formation during chemotaxis. *Systems Biology and Physiology Reports* 2021;1:6. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202103012>.
 70. Korobkin J, Sveshnikova A. A possible approach to computer simulation of the formation of platelet lamellipodia. *Systems Biology and Physiology Reports* 2022;1:9. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202263012>.
 71. Schaus TE, Taylor EW, Borisoff GG. Self-

- organization of actin filament orientation in the dendritic-nucleation/array-treadmilling model. Proceedings of the National Academy of Sciences 2007;104:7086–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701943104>.
72. Pollard TD, Berro J. Mathematical Models and Simulations of Cellular Processes Based on Actin Filaments*. Journal of Biological Chemistry 2009;284:5433–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800043200>.
73. Machta BB, Papanikolaou S, Sethna JP, Veatch SL. Minimal Model of Plasma Membrane Heterogeneity Requires Coupling Cortical Actin to Criticality. Biophysical Journal 2011;100:1668–77. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.02.029>.
74. Honigmann A, Sadeghi S, Keller J, Hell SW, Eggeling C, Vink R. A lipid bound actin mesh-work organizes liquid phase separation in model membranes. eLife 2014;3:e01671. <https://doi.org/10.7554/eLife.01671>.