

## РЕКОМБИНАНТНАЯ АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ ФОРМА $\alpha$ -ТРОМБИНА ЧЕЛОВЕКА

М. В. КОЛОДЗЕЙСКАЯ, В. И. ГРИЩУК, Т. М. ЧЕРНЫШЕНКО,  
Е. И. ЮСОВА, Т. В. ГРИНЕНКО

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев

*E-mail: bio.cherv@gmail.com*

В обзоре рассмотрены мутантные формы тромбина, которые вызывают существенные изменения геометрии активного центра, блокирование субсайтов связывания субстратов, расположенных в отдельных петлях молекулы энзима, что влечет за собой изменение конформационной подвижности молекулы и, следовательно, активности энзима, а также вопрос аллостерии тромбина, важный для идентификации взаимосвязи между его структурой и функциями, а также для развития потенциально нового направления в терапии.

**Ключевые слова:** рекомбинантный тромбин, аллостерия, мутагенез, протеин С, тромбомодулин, антикоагулянтная функция.

Система свертывания крови представляет собой каскад протеолитических реакций, которые осуществляются протеинами — факторами свертывания крови. Каждый следующий энзим является субстратом для предыдущего и таким образом проэнзим превращается в энзим [1, 2]. Ведущая роль в этом процессе принадлежит сериновым протеиназам системы свертывания крови, таким как факторы VII (VIIa), IX (IXa), X (Xa), XI (XIa) и особенно тромбину. Взаимодействуя со специфическими рецепторами клеточных мембран тромбоцитов, лейкоцитов и эндотелия, они индуцируют и регулируют процессы гемостаза. Рецепторы этой системы включают тканевой фактор (TF), рецептор тромбина (PAR1 — рецептор 1, активированный протеиназой) и тромбомодулин. Открытие рецептора PAR1 способствует пониманию того, как тромбин взаимодействует с клетками, и дает новое направление для фармакологического контроля влияния тромбина на клетки. При повреждении сосудистой стенки TF экспонируется в кровоток, и внеклеточная часть его молекулы служит рецептором для фактора VII. Комплекс TF–FVIIa является пусковым механизмом активации FX и FIX в FXa, FIXa. В присутствии своего кофактора — фактора Va (FVa)

FXa превращает протромбин в тромбин. Последний, активируя тромбоциты и вызывая превращение фибриногена в фибрин — основной структурный компонент кровяного сгустка, — обеспечивает формирование тромба. Образование следового количества тромбина резко ускоряет этот процесс, поскольку тромбин активирует факторы V, VIII, XI.

Тромбин является одним из компонентов системы гемостаза, поддерживая баланс между процессами образования тромбоза и кровотечения. Способность тромбина проявлять про- и антикоагулянтные свойства служит основанием для поиска возможности превращения тромбина в антикоагулянт в терапевтических целях. Этот поиск достигается в основном с помощью мутагенеза. Рекомбинантный тромбин не способен превращать фибриноген в фибрин, не активирует тромбоциты, не расщепляет рецепторы (PAR-1), активируемые протеиназами. Установлено, что рекомбинантный тромбин не взаимодействует со многими кофакторами свертывания крови. В то же время сохраняется его способность активировать протеин С в комплексе с тромбомодулином.

Тромбин — мультифункциональная сериновая протеиназа, являющаяся одним из основных физиологических регуляторов

системы гемостаза. Благодаря своей многофункциональности тромбин участвует в различных физиологических процессах, поддерживая динамическое равновесие между коагулянтным и антикоагулянтным звеньями гемостаза. Отличительная его черта — способность проявлять про- и антикоагулянтные свойства. Поскольку главная функция тромбина — участие в процессе образования фибринового сгустка, его способность проявлять антикоагулянтную активность представляет особый интерес для научных и клинических исследований, так как используя мутагенез, можно создавать препараты тромбина с заданными (антикоагулянтными) свойствами [1–11].

Тромбин является аллостерическим энзимом, существующим в двух формах, которые находятся в равновесии: каталитическая fast-форма и неактивная slow-форма. Связывание с  $\text{Na}^+$  изменяет равновесие в пользу fast-формы и координирует основную цепь кислородов Arg-221a и Lys-224 с четырьмя молекулами воды. Эта координация зависит от солевого мостика между Lys-224 и Glu-217 энзима. Конформация этой петли резко изменяется при замене Glu-217 на Lys, а Arg-221a непосредственно связан с  $\text{Na}^+$  и его замещение аланином также обуславливает возникновение свойств, подобных дикому типу slow-формы тромбина [12–14]. По-видимому, замещение Glu-217 лизином или аланином дестабилизирует конформацию fast-формы тромбина. В структуре активного энзима между боковой цепью Gly-217 и Thr-172 образуются водородная связь и солевой мостик ( $2,7^\circ \text{A}$ ) с Lys-224. Можно предположить, что изменение положения боковой цепи Lys-224 будет оказывать дестабилизирующий эффект на петлю  $\text{Na}^+$ -связывания. Расстояние между этими двумя  $\text{Na}^+$ -координирующими остатками Lys-224 и Arg-221a составляет  $5,4 \text{ A}$ , в то время как расстояние между их боковыми цепями —  $5,7 \text{ A}$ . Таким образом, наблюдается отталкивающий эффект между этими аминокислотными остатками. Потеря любого из солевых мостиков должна оказывать значительное влияние на энергию координационных связей  $\text{Na}^+$ . Следствием эффекта может быть уменьшение сродства  $\text{Na}^+$  к активному центру тромбина и смещение равновесия в сторону slow-конформации. Это предположение подтверждается различными мутациями в тромбине, например там, где Arg-221a и Lys-224 были заменены аланином. Обнаружено, что свойства вариантов K224A

и E217A оказались идентичными и соответствовали свойствам slow-формы дикого типа тромбина [13–15].

Тромбин играет важную роль в воспалительных процессах и эмбриогенезе, развитии нервной системы и некоторых патологических состояниях. Известные мутации в генах часто являются причиной наследственных нарушений, связанных с функционированием системы свертывания крови [16, 20]. Описаны два основных фенотипа таких мутаций. При дефиците протромбина имеют место умеренные кровотечения из-за нарушения формирования тромба [21–24]. Повышение содержания протромбина в плазме крови связано с тромбофилиями. Они широко распространены в популяциях различных стран и являются одним из самых серьезных факторов риска венозных и артериальных тромбозов [17, 24–29].

Одной из важнейших функций тромбина является его участие в активации протеина С — физиологического антикоагулянта, циркулирующего в кровотоке в виде зимогена. Протеин С является витамин К-зависимым мультидоменным протеином, состоящим из легкой и тяжелой цепей, связанных дисульфидной связью. Витамин К-зависимый домен, содержащий остаток  $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислоты (Gla-домен), и два домена, подобные эпидермальному фактору роста (EGF-домены), расположены в легкой цепи. Тяжелая цепь протеина содержит короткий активационный пептид и серинпротеиназный домен [30–35]. Gla-домен связывается с отрицательно заряженными фосфолипидными мембранами, которые важны для антикоагулянтной активности активированного протеина С (APC). Этот домен может также связывать эндотелиальный рецептор протеина С (EPCR), взаимодействие с которым имеет существенное значение как для активации протеина С, так и для проявления противовоспалительной и антиапоптотической активности APC. Функции EGF-доменов еще недостаточно изучены, но наиболее вероятно, что они важны для взаимодействия с другими протеинами, такими как протеин S, FVa и FVIIIa. Активационный пептид протеина С отщепляется во время активации его комплексом T-TM-EPCR (тройной комплекс тромбина с тромбомодулином и эндотелиальным рецептором протеина С), вследствие чего образуется активная конформация PC [36, 38].

В процессе активации тромбином системы протеина С тромбомодулин выступает в роли кофактора. Он представляет собой ре-

цептор тромбина, расположенный на поверхности эндотелия сосудов и капилляров. Значительная площадь поверхности эндотелиальной клетки и высокая концентрация тромбомодулина (ТМ) обуславливают связывание тромбина и способствуют активации протеина С [31, 38, 39]. ТМ занимает функционально важный экзосайт I в тромбине и тем самым блокирует взаимодействие с другими тромбинсвязывающими белками. Кроме того, ингибиторы тромбина антитромбин (АТ) и ингибитор протеина С (РСІ) эффективно ингибируют ТМ-связанный тромбин [30, 34, 39]. Способность ТМ связываться с тромбином, тем самым превращая его в активатор протеина С, и ускорение торможения тромбина позволяют считать ТМ одним из основных регуляторов свертывания крови. Известно, что ТМ содержит несколько доменов и его молекула является мембранным протеином типа I. За N-концевым лектинподобным доменом следуют шесть EGF-доменов [36, 41]. Ser/Thr-участок содержит боковую цепь хондроитинсульфата, который усиливает ингибирование тромбина, связанного с ТМ, АТ и РСІ. EGF-домены молекулы тромбомодулина важны для активации протеина С. При этом тромбин связывается с EGF 5 и EGF 6, в то время как протеин С взаимодействует с EGF 4, причем в этой реакции важную роль играет положительно заряженный кластер протеина С, образованный остатками основных аминокислот в серинпротеиназном домене, в состав которого входят ключевые петли на поверхности молекулы протеина С — 37, 60, 70 и 148 [30]. Активация протеина С значительно ускоряется при взаимодействии с EPCR, который связывает Gla-домен протеина С и ориентирует субстрат комплементарно активирующему комплексу Т-ТМ [32–35].

Активированный протеин С регулирует процесс свертывания крови на этапе активации протромбина в тромбин, ограничивает реакции воспаления и замедляет апоптоз эндотелиальных клеток в ответ на воспаление [36, 37, 44–47]. Основными компонентами системы РС являются тромбин, тромбомодулин, эндотелиальный рецептор протеина С (EPCR), протеин S, протеин С и активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (ТАFI) [49–53]. EPCR ускоряет активацию протеина С приблизительно в 20 раз *in vivo* при образовании активационного комплекса тромбин-тромбомодулин. Активированный протеин С (APC) сохраняет способность связываться с EPCR, и этот комплекс, очевидно, включается в сигнальный механизм

клетки, угнетающей образование воспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли, интерлейкин 6). Затем APC диссоциирует [39–42, 54–56] из комплекса с EPCR и связывается с протеином S, который является кофактором РС, с последующей инактивацией факторов Va и VIIIa, и тем самым ингибирует дальнейшую генерацию тромбина [38, 42, 43, 58]. Клинические исследования показали, что дефицит протеина С приводит к микрососудистому тромбозу (*purpura fulminans*), обуславливающему увеличение адгезии лейкоцитов и количества цитокинов. Клиническими исследованиями также установлено, что APC препятствует развитию острого сепсиса [39, 47, 54–56].

Тромбин взаимодействует со многими кофакторами, способными вызывать конформационные превращения и изменять его протеиназную активность. Однако физиологическое значение аллостерии тромбина не выяснено до сих пор [58, 59]. Наиболее значительные изменения активности тромбина вызваны связыванием энзима с ТМ, но могут быть обусловлены и другими кофакторами. В частности, отмечена важная роль связывания  $\text{Na}^+$  в модуляции активности тромбина [10, 60]. Выяснение структуры  $\text{Na}^+$ -связывающего участка энзима представляется ключевым аспектом при определении взаимоотношения структура — функция. Переход форм тромбина обусловлен связыванием ионов  $\text{Na}^+$  на участке энзима, расположенного в пределах цилиндрической полости, которая образована тремя антипараллельными  $\beta$ -структурами В-цепи (Met-180-Tyr-184a, Lys-224-Tyr-228 и Val-213-Gly-219), диагонально пересекаемыми тяжем Glu-188 Glu-192. Этот участок окружен петлей, соединяющей последние две  $\beta$ -структуры, и располагается на расстоянии более чем  $1,5 \text{ \AA}$  от каталитической триады активного центра тромбина. Цилиндрическая полость, проходящая через субстратсвязывающий участок активного центра тромбина, локализована рядом с карманом его первичной специфичности, который содержит на дне остаток Asp-189. Связанный ион  $\text{Na}^+$  координируется в форме октаэдра карбонильными атомами кислорода Tyr-184a, Arg-221a, Lys-224 и тремя молекулами воды, погруженными в молекулу тромбина [61, 62]. Предполагают, что связывание тромбина с  $\text{Na}^+$  или ТМ при взаимодействии с субстратами вызывает конформационные изменения активного центра энзима, особенно в его щели и в остатках Trp-60d и Trp-215

[61, 63, 64]. В предварительных исследованиях было выявлено, что мутации в  $\text{Na}^+$ -связывающем участке тромбина изменяют равновесие в пользу конформации slow-формы. При этом, исследуя изменение структуры активного центра, можно четко идентифицировать аллостерию тромбина в гемостазе. Однако до сих пор не обнаружено никакой другой структуры активного центра, кроме slow-формы [59, 65]. Вопрос аллостерии тромбина особенно важен для развития новой терапии. Наличие тромбина в slow-форме позволит широко использовать его в медицине в качестве антикоагулянта [10, 60, 66, 67]. С этой целью в ряде исследований были применены приемы мутагенеза для получения рекомбинантного тромбина, проявляющего себя на моделях животных как эффективный антикоагулянт, через стимуляцию протеина C [68–73]. Исследуя антикоагулянтную функцию тромбина, можно теоретически представить сложную взаимосвязь между структурой протеинов и их функциями, а практически — использовать полученную информацию в медицине при лечении воспалительных процессов различной этиологии, а также ингибирования апоптоза [68–73].

Наряду с исследованиями естественных мутаций молекулы  $\alpha$ -тромбина (например, его мутаций в А-цепи) методами протеиновой инженерии создан ряд антикоагулянтных форм энзима и разработан рациональный проект оптимальной специфичности и мощности антикоагулянта тромбина *in vivo*. С этой целью были исследованы различные мутанты тромбина, в молекулах которых проведена замена отдельных аминокислотных остатков непосредственно в  $\text{Na}^+$ -связывающем сайте молекулы энзима или вблизи его, экзосайте I или в его аполярном сайте, либо в отдельных петлях активного центра. Остатки аминокислот тромбина, расположенные в наиболее важных функциональных участках энзима, а именно в экзосайте I, экзосайте II, петле 60, специфических участках S1-S4 и в  $\text{Na}^+$ -связывающем сайте, подвергали сайт-направленному мутагенезу. В этих исследованиях значительное внимание уделено конформационным превращениям молекулы тромбина, о чем свидетельствует представленный ниже материал, в котором показана возможность моделировать производные тромбина с заданной специфичностью, комбинируя отдельные мутанты с определенными структурами их молекул.

Обнаружение факта  $\text{Na}^+$ -зависимой аллостерической активации хотя и усложнило

выяснение механизма специфичности тромбина, но в то же время привело к четкому выводу, что ионы  $\text{Na}^+$  выполняют роль аллостерического эффектора в реализации двух конформационных состояний энзима, осуществляющих соответственно две фундаментальные и конкурирующие функции в процессе гемостаза. Следует отметить, что координационная ячейка иона  $\text{Na}^+$  образуется молекулами воды и атомами полипептидной цепи энзима [62, 74–76]. Из данных литературы известно, что только одна из четырех молекул воды образует связь между  $\text{Na}^+$ -связывающим участком и боковой цепью Asp-189 кармана первичной специфичности. Если ион  $\text{Na}^+$  удалить из ячейки, то молекула воды меняет свое расположение, боковая цепь Asp-189 становится неподвижной и приобретает ориентацию, менее благоприятную для электростатического связывания с гуанидиновой группой боковой цепи Arg в положении P1 субстрата [75]. Данные, представленные рядом авторов, показали, что остаток Asp-189, во-первых, определяет первичную специфичность энзима, а, во-вторых, принимает не прямое участие в координационных связях с ионами  $\text{Na}^+$ . Замена Asp-189 тромбина на Ala, Asn, Glu или Ser резко уменьшает специфичность энзима по отношению к субстратам, содержащим Arg и Lys в положении P1, что подтверждает важную роль Asp-189 тромбина в связывании субстратов [2, 9, 73, 75]. Рентгенструктурные исследования мутантных форм тромбина показали изменение ориентации Asp-189, что не обеспечивает оптимального связывания различных соединений. На основании этих данных был сделан вывод о том, что изменение полярности остатка Asp-189 является источником значительных структурных перестроек тромбина, обуславливающих заметное изменение каталитической активности и отрицательно влияющее на его двойную функцию.

Исследование специфичности тромбина к одновалентным катионам в последнее время осуществляют методом прямого мутагенеза. Показано, что петли 220 и 186 определяют размер щели молекулы тромбина, которая рассматривается как вход в  $\text{Na}^+$ -связывающий участок [72, 73, 77]. Обнаружено, что структура петли 220 весьма консервативна, в отличие от петли 186, проявляющей заметную вариабельность. Были созданы мутанты как с удлиненными вставками в петле 186, так и без них. Сделан ряд замещений аминокислот в положениях Pro-186, Asp-186a, Glu-186b, Lys-186d и Arg-187a

на аланин, что способствует уменьшению длины петли. Кроме того, были удалены четыре остатка вставок 186 a–d. Замещения Ala в положениях Pro-186, Asp-186a, Glu-186b и Lys-186d оказывали умеренный эффект на активность тромбина. Полученные мутанты не имели сродства к ионам  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , хотя предпочтительное связывание  $\text{Na}^+$  по сравнению с  $\text{K}^+$  было сохранено во всех случаях [77–79].

Был создан мутант quad A' [77], содержащий вставки четырех остатков Ala. Использование хромогенных субстратов показало снижение каталитической активности, что вызвано, с одной стороны, ухудшением  $\text{Na}^+$ -связывания, а с другой — резким изменением одновалентной катионной специфичности по сравнению с диким типом энзима. Сродство мутанта quad A' к ионам  $\text{K}^+$  оказалась почти в 10 раз выше, чем к ионам  $\text{Na}^+$ . Профиль связывания катионов у него существенно отличается по сравнению с диким типом. Замена Arg-187 на Ala резко уменьшает сродство энзима к ионам  $\text{Na}^+$ . Известно, что Arg-187 стабилизирует  $\text{Na}^+$ -связывающий участок тромбина за счет взаимодействия ионной пары Asp-221 и Asp-222. Как и следовало ожидать, в мутантном протромбине Greenville обнаружена замена R187Q, что изменяет интенсивность кровотечения. Отсутствие каталитической активности у мутанта может служить примером того, как утрата способности связывать ионы  $\text{Na}^+$  стабилизирует тромбин в антикоагулянтной slow-форме [9, 77, 80].

Описан весьма интересный мутант, в котором два остатка Asp заменены на аланин и лизин [62, 81, 82]. У такого двойного мутанта D221A/D222K (ARK) сродство к ионам  $\text{Na}^+$  оказалось гораздо меньше. При исследовании каталитической функции ARK показано, что его взаимодействие с фибриногеном и гирудином более эффективно в slow-форме, чем в fast-форме по сравнению с диким типом.

Связывание ионов  $\text{Na}^+$  вблизи кармана первичной специфичности увеличивает прокоагулянтную, протромбиновую и регуляторную активность тромбина. Этот эффект отражает аллостерическую связь между  $\text{Na}^+$ -связывающим сайтом и сайтами, обеспечивающими узнавание субстрата. Функциональный эпипептид участка связывания ионов натрия, неидентифицированный Аласкирующим мутагенезом, обозначили как «аллостерическое ядро», обуславливающее slowfast переход форм энзима [82]. Было установлено, что практически все остатки ал-

лостерического ядра располагаются вокруг  $\text{Na}^+$ -связывающего участка, и ни один из них не обнаружен в экзосайте I, II или петле 60 [82–84]. На эффективность участка связывания  $\text{Na}^+$  оказывают значительное влияние мутации Asp-189, Glu-217, Asp-222 и Tyr-225. Как было отмечено ранее, Asp-189 обеспечивает правильную ориентацию одной из четырех молекул воды, участков связывания ионов  $\text{Na}^+$  энзима и P1-остатка субстрата [77]. Аминокислота Glu-217 определяет полярные контакты с Lys-224 и Thr-172, что помогает стабилизировать петлю 220 в  $\text{Na}^+$ -участке узнавания субстрата. Мутации Lys-224 и Thr-172 также влияют на эффективность связывания  $\text{Na}^+$ , хотя и в меньшей степени по сравнению с E217A. Известно, что естественный мутант тромбина Scampton, имеющий замещение K224T, вызывает характерное кровотечение из-за снижения сродства  $\text{Na}^+$  к энзиму [85]. Ионная пара между Arg-187 и Asp-222 связывает петлю 186 с петлей 220, что обеспечивает стабильность соотношения размера входа катиона с его связывающим участком [74]. Мутация Arg-187 также оказывает влияние на  $\text{Na}^+$ -связывание, но в меньшей степени по сравнению с D222A. Во встречающемся в природе мутанте протромбина Greenville замена R 187Q обуславливает характер кровотечения из-за снижения эффективности связывания  $\text{Na}^+$  с энзимом [80]. Аминокислота Tyr-225 играет важную роль в определении  $\text{Na}^+$ -зависимой аллостерической природы сериновых протеиназ, обеспечивая ориентацию аминокислотного остатка 224, что способствует правильной ориентации ионов  $\text{Na}^+$ . Боковая цепь Tyr-225 также обеспечивает целостность водных каналов, которые внедрены в карман первичной специфичности и необходимы для правильного узнавания субстратов [10, 11].

Четыре остатка аллостерического ядра занимают критические позиции около участка связывания ионов  $\text{Na}^+$  и помогают сохранить целостность координационной ячейки вокруг катиона. Аллостерическое ядро способствует правильному расположению других остатков аминокислот (Thr-172, Tyr-184a, Arg-187, Ser-214 и Gly-2230), замещение которых на Ala в 10 раз уменьшает связывание  $\text{Na}^+$ . В тромбине Thr-172 расположен на некотором расстоянии от кармана первичной специфичности и выполняет особую роль в связывании с Glu-217, что обеспечивает контакт аминокислот Ile-174 с ароматическим участком узнавания S3–S4. Поэтому можно считать, что Thr-172 связывает

Glu-217 аллостерического ядра с остатками, участвующими в узнавании субстратов [64, 75, 76, 82]. Аминокислота Tyr-184a обеспечивает «заякоривание» молекулы воды, которая принимает участие в координации  $\text{Na}^+$ -связывающего участка тромбина. Arg-187 образует ионную пару с Asp-222 в аллостерическом ядре. Аминокислоты Ser-214 и Gly-223 поддерживают конформацию активного центра тромбина, принимая таким образом участие в его каталитическом действии. Следовательно, четыре остатка аллостерического ядра (Asp-189, Glu-217, Asp-222 и Tyr-225) и пять соседних аминокислотных остатков (Thr-172, Tyr-184a, Arg-187, Ser-214, Gly-223) образуют сеть, которая структурно и энергетически соединяет  $\text{Na}^+$ -связывающий участок с карманом специфичности S3-S4 и участком специфичности S1 [10, 11, 73].

Среди этих остатков Asp-189 вместе с Asp-221 определяет возрастание каталитической активности тромбина в результате связывания ионов  $\text{Na}^+$ . Asp-189 и Asp-221 рассматриваются как ключевые остатки, контролирующие связывание субстратов fast-формой тромбина. Asp-189 является частью аллостерического ядра и определяет первичную специфичность энзима, координируя комплементарно гуанидиновую группу Arg при  $\text{P}_1$  субстрата. Asp-221 является главным компонентом участка  $\text{Na}^+$ -связывания с его боковой цепью, перемещая одну из четырех молекул воды и соединяя ионы  $\text{Na}^+$  через H-связывание с аминокислотой Asp-189. Мутация Asp-221 не влияет на эффективность связывания  $\text{Na}^+$ , но почти устраняет вызываемое ионами  $\text{Na}^+$  увеличение эффективности гидролиза субстрата. Следует отметить, что аминокислота Asp-221 абсолютно консервативна в молекулах тромбина различного происхождения, что подтверждает решающую роль этого остатка в проявлении аллостерических свойств энзима. Полученные результаты свидетельствуют о том, что аллостерическое влияние  $\text{Na}^+$ -связывания на каталитическую активность тромбина обусловлено определенными аминокислотными остатками энзима. Этот факт важен для будущих исследований, направленных на создание (инженерию) участка  $\text{Na}^+$ -связывания и увеличение каталитической активности тех протеиназ, у которых отсутствует это свойство [3, 64, 75, 76]. Показано, что переход из slow- в fast-форму тромбина приводит к образованию ионной пары между Arg-187 и Asp-222, что стабилизирует петли 220 и 186 и изменяет положение атома кислорода D221 для оптимальной

координации; к смещению в боковой цепи Asp-189 для оптимального электростатического взаимодействия с гуанидиновой группой  $\text{P}_1$  остатка аргинина субстрата; к смещению в боковой цепи Glu-192 как промежуточного звена, что сопровождается изменением расположения молекулы воды, которая связана с Ser-195 для оптимальной нуклеофильной атаки входящего субстрата.

Переход тромбина из slow- в fast-форму оптимизирует его прокоагулянтную и сигнальную функции. Однако ориентация Glu-192 в slow-форме вызывает неблагоприятные изменения вокруг Asp-189 и Ser-195 и ослабляет электростатическое взаимодействие с кислотными остатками протеина С при  $\text{P}_3$  и  $\text{P}_3'$  [75, 76]. Это объясняет, почему генетические дефекты приводят к ухудшению  $\text{Na}^+$ -связывания, как, например, у протромбинов Franfurct [64], Salakta [65], Greenville [67], Scranton [83–87].

Интересно, что существенное различие между двумя аллостерическими формами тромбина выявлено в структуре сети молекул воды, расположенной между  $\text{Na}^+$ -связывающим участком и остатком активного центра энзима. Функциональная роль этой сети заключается в обеспечении связывания отдельных остатков молекулы энзима в пространстве. Эта сеть соединяет  $\text{Na}^+$ -связывающий участок с аминокислотой Ser-195, расположенной на расстоянии  $> 1,5$  нм от активного центра тромбина, используя как промежуточные звенья боковые цепи Asp-189 и Glu-192. Аллостерические свойства тромбина, вероятно, зависят от структуры сети молекул воды, которая обеспечивает передачу информации от участка ионов  $\text{Na}^+$  к Ser-195 активного центра. Следует отметить, что изменения в ней и аллостерическом ядре  $\text{Na}^+$ -связывающего сайта энзима являются основным звеном повышения сродства между тромбином и субстратом, а также механизма активации энзима ионами  $\text{Na}^+$  [88–90].

При исследовании мутагенеза тромбина обнаружено, что замена остатков W50, K52, E229, R223 аланином изменяет субстратную специфичность тромбина в сторону антикоагулянтной активности *in vivo* [69, 91]. В процессе мутагенеза этих остатков естественно встречающимися аминокислотами была получена единственная мутация E229K, в которой в 130 раз повышена антикоагулянтная специфичность к субстрату протеина С по сравнению с прокоагулянтной активностью на фибриногене. Тромбин E229K оказался также менее эффективным в активации

тромбоцитов, более устойчивым к ингибированию антитромбином III (в присутствии и при отсутствии гепарина) и имел пролонгированный период полужизни в плазме крови *in vitro*. Таким образом, E229K тромбин проявляет себя как мощный и специфический активатор эндогенного протеина С и как антикоагулянт *in vivo*. Подобный рекомбинантный тромбин в slow-форме был создан комбинацией мутантов E217A и W215A [86, 91, 92].

Двойной мутант тромбина W215A/E217A обладает очень низкой каталитической активностью по отношению к хромогенным и природным субстратам, но эффективно активирует протеин С в присутствии тромбомодулина. Чтобы объяснить выраженные антикоагулянтные свойства этого мутанта, было проведено рентгеноструктурное исследование кристаллических форм как свободного энзима, так и в комплексе с активным участком ингибитора H-D-Phe-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>-Cl (PPACK). Оказалось, что PPAКC-связанная структура W215A/E217A идентична PPAКC-slow-форме тромбина. С другой стороны, в структуре свободной формы энзима обнаружено разрушение участка 215–217, обуславливающее исчезновение множества взаимодействий между Phe-227, Trp-215, Glu-217 с Thr-172 и Lys-224 и изменение первичной специфичности тромбина [71, 93].

Другие значительные изменения вызваны свободным вращением карбоксильной группы Asp-189, разрушением H-связи между каталитическими Ser-195 и His-57, разрывом ионной пары между Asp-222 и Arg187 и значительными структурными изменениями в петлях 186 и 220, которые входят в Na<sup>+</sup>-связывающий сайт энзима. Эти данные объясняют низкую каталитическую активность W215A/E217A и показывают, что анализ механизма узнавания субстрата тромбином и другими протеиназами на молекулярном уровне требует кристаллизации как свободной, так и связанной форм энзима [64, 75, 76].

Следует отметить, что Pineda и соавт. [75–77], исследуя мутант тромбина R77aA, в котором отсутствует аутопротеолитическая деградация при экзосайте 1, показали, что на рекомбинантный тромбин не оказывали действия различные ингибиторы и эффекторы. Этот мутант стабилизирован в slow-форме, при этом выявлено только незначительное отличие структуры его молекулы от обычной структуры Na<sup>+</sup>-связанной fast-формы энзима. Наиболее заметными различиями являются перемещение

Asp-189 в S1 кармане специфичности, сдвиг участка 190-193, перемещение боковой цепи Glu-192 и значительное перемещение каталитического S-195. Именно структура slow-формы тромбина объясняет снижение его специфичности к синтетическим и природным субстратам и предполагает молекулярную основу его антикоагулянтных свойств [92].

В мутанте W215A/E217A определена величина  $k_{cat}/K_m$  при высвобождении фибринопептида А из фибриногена, которая уменьшается в 20 000 раз по сравнению с диким типом тромбина, тогда как активация протеина С в присутствии тромбомодулина повышается почти в семь раз [69, 96]. Изменение в специфичности энзима вызывает антикоагулянтный эффект, усиливающийся снижением скорости инактивации энзима антитромбином в присутствии гепарина в 3 000 раз. Это предполагает удлинение времени жизни мутанта в крови по сравнению с менее мощными антикоагулянтными тромбинами, уже исследуемыми *in vivo* [65, 67]. Мутант W215A/E217A практически не активен по отношению к прокоагулянтным субстратам (фибриногену и PAR1) и не способен вызывать значительную агрегацию тромбоцитов *in vivo*. При физиологических условиях дикий тип тромбина в концентрации 4 нМ свертывает фибриноген за 30 с, мутант W215A/E217A расщепляет и активирует протеин С в присутствии тромбомодулина со скоростью в 6 раз меньшей, чем дикий тип. Увеличивая концентрацию тромбина до 12 нМ (его концентрация *in vivo*), можно достичь скорости активации протеина С в пределах 50% от величины дикого типа, в то время как для свертывания фибриногена необходимо более двух суток. Низкая активность в отношении прокоагулянтных субстратов, незначительная скорость ингибирования антитромбином III и заметная скорость гидролиза протеина С в присутствии физиологического кофактора тромбомодулина дает основания считать мутантный тромбин W215A/E217A мощным антикоагулянтом [93, 94]. Мутант практически не активен по отношению к природным субстратам, пока не связан с тромбомодулином, и поэтому может играть главным образом антикоагулянтную роль в микроциркуляции, когда концентрация тромбомодулина высокая и необходима стабилизация гемостаза [64, 75, 76].

Carter и соавт. [59] получили рекомбинантный тромбин E217K. Обнаружено, что этот мутант представляет собой каталитически инертный тромбин со значительно измененной

геометрией молекулы, обуславливающей изменение водородного связывания, а также стерической блокировки субстратсвязывающих сайтов активного центра. Целесообразность этой структуры обсуждалась в связи с физиологическим равновесием между slow- и fast-состоянием и аллостерией тромбина в гемостазе. Чтобы сравнить общую структуру E217K с другими структурами тромбина, необходимо было выбрать 150 наиболее соответствующих параметров. Было показано, что структура E217K тромбина существенно отличалась от дикого типа тромбина. Участки, конформация которых подвергалась значительному изменению основной цепи, следующие: 1) петля-60; 2) остаток 73–76; 3) остаток 95–98; 4)  $\gamma$ -петля; 5) петля 186; 6) остатки 192 и 193, 7) петля от 215 до 223; 8) N- и C-концевые участки молекулы энзима. Из указанных изменений структур наиболее значимым для каталитической функции тромбина является перемещение остатков 192 и 193 и петли, которые содержат точечную мутацию E217K [12, 59, 64]. Обнаружено, что каталитическая активность E217K тромбина значительно снижена по отношению к фибриногену, хромогенному субстрату S2238 (D-Phe-Pip-Arg-pNA) и антитромбину (в 270, 250 и 22 раза соответственно) по сравнению с диким типом. Это происходит из-за изменений кинетических величин — увеличения  $K_m$  и уменьшения  $k_{cat}$ . Исследованиями варианта E217K установлены факторы, приводящие к снижению каталитической активности энзима. Показано, что E217K тромбин неактивен вследствие измененного водородного связывания остатков его активного центра. Водородное связывание в активном центре варианта E217K оказалось весьма необычным и обусловило стерическое блокирование участков субстратного связывания и каталитическую несостоятельность структуры активного центра. Определенная ориентация каталитической триады Asp-102, His-57 и Ser-195 необходима для нуклеофильной атаки O $\gamma$  Ser-195 на карбонильный углерод расщепляемой связи [12, 59, 64]. Конформация тетраэдра, которая образуется при этом, стабилизируется оксианионной полостью, возникающей при взаимодействии амидных водородов Gly-193 и Ser-195. В структуре E217K тромбина Glu-192 сдвигает положение боковой водородной связи основной цепи с амидным водородом Ser-195. Оксианионная полость в дальнейшем перестраивается вследствие перемещения остатков аминокислот Gly-193 и Glu-192. Резкое пе-

ремещение Glu-192 в структуре молекулы тромбина приводит к экранированию Ser-195. Таким образом, измененная картина водородного связывания в активном центре варианта тромбина E217K делает его каталитически инертным, блокируя доступ субстрата к активному центру и изменяя геометрию расположения аминокислотных остатков, необходимых для катализа.

Кроме эффекта измененных водородных связей активного центра на  $k_{cat}$  E217K тромбина, структура участков, примыкающих к каталитическому центру, также приводит к значительному увеличению  $K_m$ . Физиологическая специфичность тромбина часто определяется взаимодействием экзосайтов, но для отдельных пептидных субстратов и ингибиторов специфичность определяется главным образом позицией P1, P2 и P4 при расщеплении связей между P1 и P1' [41, 94]. Это соответствует карманам связывания S1 и S2 и арилсвязывающему участку (или S4) тромбина. Основным эффектом структурной перестройки молекулы тромбина E217K является сжатие щели активного центра тромбина. Дикий тип тромбина имеет открытую щель активного центра с наружным каталитическим O $\gamma$  серина, тогда как мутант E217K имеет закрытый активный центр и полностью экранирован O $\gamma$  Ser-195. Структура комплекса Михаэлиса между тромбином и кофактором II гепарина обеспечивает самую лучшую модель взаимодействия тромбин-субстрат [81, 82]. Если структуру аллостерически активированного тромбина совместить со структурой тромбина в комплексе с этим серпином, реактивная основная петля ингибитора легко расположится между P4 и P4'. Однако, если таким способом исследовать вариант E217K, субстратная петля кофактора II — гепарин не может располагаться подобным образом. Основное нарушение связывания обнаружено между участком P4-P1 субстрата и боковой цепью атомов щели активного центра энзима: P1Leu блокируется от S1 кармана аминокислотами Cys-191, Glu-192, Gly-216, и эффект будет более сильным с Arg в P1 позиции субстрата, Pro в положении P2 субстрата перекрывается петлей Trp-60d и Glu-192; Met P3, остатками Trp-215 и Asp221; P4 Phe перекрывается боковой цепью Trp-215 молекулы энзима.

Таким образом, антитромботические свойства E217K тромбина связаны с неспособностью энзима превращать фибриноген в фибрин, а его тромбомодулинзависимая функция активации протеина C сохраняется. Показано, что E217K тромбина вызывает



существенное разрушение активного центра энзима. В частности, представляет интерес перемещение Glu-192, которое связано с Ser-195 водородными связями, что приводит к полной закупорке активного центра и деструкции его оксианионной полости. При этом обнаружено, что субстратсвязывающие участки в значительной степени блокированы аминокислотными остатками, предварительно вовлеченными в аллостерию тромбина. Постулируется, что мутации вызывают аллостерическую инактивацию тромбина дестабилизацией  $\text{Na}^+$ -связывающего участка молекулы энзима, которая представляет  $\text{Na}^+$ -свободную каталитически инертную slow-форму.

О роли дисульфидных связей в каталитическом домене сериновых протеаз известно немного. Предварительное изучение функций мутанта трипсина C191A/220A не привело к получению убедительных данных о роли дисульфидной связи Cys-191-Cys-220 [95, 96]. В то же время результаты, полученные при изучении мутанта тромбина C191A/C220A, показали примерно 100-кратную потерю активности по отношению к некоторым хромогенным и природным субстратам, имеющим Arg или Lys при P1[97]. Дисульфидная связь Cys-191-Cys-220 расположена между участком 190, который связывает оксианионную полость с  $\text{Na}^+$ -связывающим сайтом молекулы тромбина. Рентгеноструктурным анализом (разрешение 1,54 Å) структуры C191A/C220A мутанта обнаружена конформация, подобная  $\text{Na}^+$ -свободной slow-форме дикого типа энзима. Установлено, что отсутствие дисульфидной связи ориентирует боковую цепь Asp-189 к растворителю, затрагивает атом кислорода Gly-219 и вызывает беспорядок в участке петель 186 и 220, определяющих  $\text{Na}^+$  сайт тромбина. Эта конформация мутанта с  $\text{Na}^+$ -сайтом и активным центром, доступным субстратам, дает представление о недавно идентифицированной  $\text{E}^*$  форме тромбина [97].

Нарушение структуры петель 186 и 220 и смещение Gly-219 корректируются активным участком ингибитора H-D-Phe-Pro-Arg- $\text{CH}_2\text{Cl}$ , что показано с помощью рентгеноструктурного анализа (разрешение 1,8 Å). На основании результатов исследования был сделан вывод, что дисульфидная связь Cys-191-Cys-220 стабилизирует карман первичной специфичности, экранируя Asp-189 от растворителя и ориентируя атом кислорода пептидного остова Gly-219 для оптимального связывания субстрата. Кроме того, дисульфидная связь стабилизирует петли 186

и 220, которые являются основными для  $\text{Na}^+$ -связывания и активации. Удаление дисульфидной связи Cys-191-Cys-220 в мутанте C191A/220A оказывает значительный эффект на связывание с антитромбином, что связано с перестройкой петель 186 и 220 в дополнение к перестройке кармана первичной специфичности [98].

Рентгеноструктурным анализом кристаллических структур свободной (CCF) и РРАСК-ингибированной (CCB) форм C191A/C220A мутанта выявлено изменение отдельных участков молекулы энзима, вызванное удалением дисульфидной связи. Структура CCF, в отличие от CCB, свидетельствует об автолизе некоторых петель, особенно участков петель 186 и 220, определяющих  $\text{Na}^+$ -сайт. Активный центр ингибитора корректирует структурное нарушение, вызванное мутацией, и создает архитектуру молекулы, подобную к таковой у дикого типа тромбина, что недавно подтверждено для мутанта W215A/E217A [99].

Отсутствие в структуре CCF вынужденного стерического соответствия для связывания субстрата с активным центром делает эту структуру приемлемой для аллостерии тромбина. Существуют три доминантные формы тромбина, две — в  $\text{Na}^+$ -свободной ( $\text{E} + \text{E}^*$ ) и одна — в  $\text{Na}^+$ -связанной ( $\text{E} : \text{Na}^+$ ) конформации [97, 99, 100]. Структура CCF имеет свойства, характерные для slow-формы тромбина, хотя некоторые из них имеют существенные отличия. Форма  $\text{E}^*$  отличается от формы E тромбина, поскольку не может связывать  $\text{Na}^+$  и, таким образом, мутант C191A/C220A становится неспособным к связыванию  $\text{Na}^+$  [97, 100]. По результатам предварительных спектроскопических исследований было сделано предположение, что  $\text{E}^*$  может быть также неактивным по отношению к некоторым субстратам [74] и, как сообщено недавно для кристаллической структуры D102N мутанта тромбина, в этой форме энзима обнаружена самоингибирующая конформация с  $\text{Na}^+$ -связывающим участком и закрытым активным центром [101,102].

Таким образом, в представленном выше материале приведен ряд мутаций молекулы тромбина, нарушающих функционирование прокоагулянтных, антикоагулянтных факторов и системы фибринолиза.

Исследован ряд различных мутаций молекулы тромбина, которые вызваны изменением аминокислотных остатков как в анионном и аполярном сайтах активного центра энзима, так и в  $\text{Na}^+$ -связывающем сайте

молекулы тромбина. Эти мутации вызывают: 1) закупорку щели активного центра тромбина; 2) блокирование участков связывания субстратов; 3) дестабилизацию Na<sup>+</sup>-связывающего сайта молекулы тромбина; 4)

усиление взаимодействия энзима с протеином С (через тромбомодулин); 5) обуславливают существование slow-формы тромбина, в каталитически инертной молекуле которой отсутствует Na<sup>+</sup>.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Davie E. W.* Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade // *J. Thromb. Haemost.* — 1995. — V. 74. — P. 1–6.
2. *Аасрум М., Придз Х.* Избирательное выключение генов тканевого фактора, фактора X и фактора VII у мышей: участие этих факторов в эмбриональном развитии // *Биохимия.* — 2002. — Т. 67, № 1. — С. 30–39.
3. *Dang Q. D., Vindigni A., Di Cera E.* An allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — V. 92, N 13. — P. 5977–5981.
4. *Hoffman M.* Remodeling the blood coagulation cascade // *J. Thromb. Thrombolys.* — 2003. — V. 16. — P. 17–20.
5. *Mann K. G., Brummel K., Butenas S.* What is all that thrombin for? // *J. Thromb. Haemost.* 2003. — V. 79. — P. 1504–1514.
6. *Dahlbäck B.* Progress in the understanding of the protein C anticoagulant pathway // *Int. J. Hematol.* — 2004. — V. 79. — P. 109–116.
7. *Esmon C. T.* Regulation of blood coagulation // *Biochem. Biophys. Acta.* — 2000. — V. 1477. — P. 349–360.
8. *Di Cera E.* Thrombin interactions // *Chest.* — 2003. — V. 124, N 3. — P. 119–179.
9. *Prasad S., Cantwell A. M., Bush L. A. et al.* Residue Asp-189 Controls both Substrate Binding and the Monovalent Cation Specificity of Thrombin // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279, N 11. — P. 10103–10108.
10. *Колодзейская М. В., Волков Г. Л.* Ионы натрия как эффектор каталитического действия  $\alpha$ -тромбина // *Укр. біохім. журн.* — 2007. — Т. 79, № 1. — С. 5–21.
11. *Колодзейская М. В., Соколовская Л. И., Волков Г. Л.* Роль А-цепи в функционировании активного центра  $\alpha$ -тромбина человека // *Биохимия.* — 2008. — Т. 73, № 3. — С. 293–302.
12. *Baglin T. P., Carrell R. W., Church F. C. et al.* Crystal structures of native and thrombin-complexed heparin cofactor II reveal a multi-step allosteric mechanism // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — V. 99. — P. 11079–11084.
13. *Dang Q. D., Guinto E. R., Di Cera E.* Rational engineering of activity and specificity in a serine protease // *Nat. Biotechnol.* — 1997. — V. 15. — P. 146–149.
14. *Guinto E. R., Di Cera E.* Critical role of W60d in thrombin allostery // *Biophys. Chem.* — 1997. — V. 64. — P. 103–109.
15. *De Filippis V., De Dea E., Lucatello F., Frasson R.* Effect of Na<sup>+</sup> binding on the conformation, stability and molecular recognition properties of thrombin // *Biochem. J.* — 2005. — V. 396. — P. 485–492.
16. *Струкова С. М.* Тромбин — регулятор процессов воспаления и репарации тканей // *Биохимия.* — 2001. — Т. 66, № 1. — С. 14–27.
17. *Патрушев Л. И.* Генетические механизмы наследственных изменений гемостаза // *Биохимия.* — 2002. — Т. 67, № 1. — С. 40–55.
18. *Di Cera E., Dang Q. D., Ayala Y. M.* Molecular mechanisms of thrombin function // *Cell. Mol. Life. Sci.* — 1997. — V. 53. — P. 701–730.
19. *Becker R. C., Spencer F. A.* Thrombin: structure, biochemistry, measurement, and status in clinical medicine // *J. Thromb. Thrombolys.* — 1998. — V. 5. — P. 215–229.
20. *Дугина Т. Н., Киселева Е. В., Частов И. В., и др.* Рецепторы семейства PAR — связующее звено процессов свертывания крови и воспаления // *Биохимия.* — 2002. — Т. 67, № 1. — С. 77–87.
21. *Turgeon V. L., Salman N., Houenou L. J.* Thrombin: a neuronal cell modulator // *Thromb. Res.* — 2000. — V. 99. — P. 417–427.
22. *Bobofchak K. M., Pineda A. O., Mathews F. S., Di Cera E.* Energetic and Structural Consequences of Perturbing Gly-193 in the Oxyanion Hole of Serine Proteases // *J. Biol. Chem.* — 2005. — V. 280, N 27. — P. 25644–25650.
23. *Feistritz C., Schuepback R. A., Mosnier L. O. et al.* Protective Signaling by Activated Protein C Is Mechanistically Linked to Protein C Activation on Endothelial Cells // *Ibid.* — 2006. — V. 281, N 29. — P. 20077–20084.
24. *Rosendaal F. R., Siscovick D. S., Schwartz S. M. et al.* A Common Prothrombin Variant (20210 Y to A / Increases the Risk of Myocardial Infarction in Young Women) // *Blood.* — 1997. — V. 90. — P. 1747–1750.
25. *Дериан С. К., Демьяно Б. П., Д’Андре М. Р., Андраде-Гордон П.* Регуляция тромбином клеточных функций через рецепторы, расщепляемые протеиназами: применение для терапии // *Биохимия.* — 2002. — Т. 67, № 1. — С. 66–77.

26. *Stubbs M. T., Bode W.* A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure // *Thromb. Res.* — 1993. — V. 69, N 1 — P. 1–58.
27. *Stubbs M. T., Bode W.* The clot thickens: Clues provided by thrombin structure // *Trends Biochem. Sci.* — 1995. — V. 20. — P. 23–28.
28. *Huntington J. A., Baglin T. P.* Targeting thrombin-rational drug design from natural mechanisms // *Trends Pharmacol. Sci.* — 2003. — V. 24. — P. 589–595.
29. *Huntington J. A.* Mechanisms of glycosaminoglycan activation of the serpins in hemostasis // *J. Thromb. Haemost.* — 2003. — V. 1. — P. 1535–1549.
30. *Dahlbäck B., Villoutreix B. O.* The anticoagulant protein C pathway // *FEBS Lett.* — 2005. — V. 579. — P. 3310–3316.
31. *Dahlbäck B.* Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: Genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases // *J. Intern. Med.* — 2005. — V. 257. — P. 209–223.
32. *Kask L., Trouw L. A., Dahlbäck B. et al.* The C4b-binding protein-protein S complex inhibits the phagocytosis of apoptotic cells // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279. — P. 23869–23873.
33. *Riewald M., Ruf W.* Science review: Role of coagulation protease cascades in sepsis // *Crit. Care Med.* — 2003. — V. 7. — P. 123–129.
34. *Levi M.* Current understanding of disseminated intravascular coagulation // *Br. J. Haematol.* — 2004 — V. 124. — P. 567–576.
35. *Webb J. H., Villoutreix B. O., Dahlback B. et al.* Localization of a hydrophobic binding site for anticoagulant protein S on the 3-chain of complement regulator C4b-binding protein // *J. Biol. Chem.* — 2001. — V. 276, N 6. — P. 4330–4337.
36. *Esmon C. T.* The PC pathway // *Chest.* — 2003. — V. 124, N 3. — P. 268–328.
37. *Esmon C. T.* Interactions between the innate immune and blood coagulation systems // *Trends. Immunol.* — 2004. — V. 25. — P. 536–542.
38. *Esmon C. T.* The endothelial cell protein C receptor // *J. Thromb. Haemost.* — 2000. — V. 83. — P. 639–643.
39. *Dahlbäck B.* The discovery of activated protein C resistance // *Ibid.* — 2003. — V. 1. — P. 3–9.
40. *Rezaie A. R.* Exosite-dependent regulation of the protein C anticoagulant pathway // *Trends Cardiovasc. Med.* — 2003. — V. 13. — P. 8–14.
41. *Griffin J. H., Zlokovic B., Fernandez J. A.* Activated protein C: potential therapy for severe sepsis, thrombosis, and stroke // *Semin Hematol.* — 2002. — V. 39. — P. 197–205.
42. *Weiler H., Isermann B.H.* Thrombomodulin // *J. Thromb. Haemost.* — V. 1. — P. 1515–1524.
43. *Verhamme J. M., Olson S. T., Tollefsen D. M. et al.* Binding of exosite ligands to human thrombin. Re-evaluation of allosteric linkage between thrombin exosites I and II // *J. Biol. Chem.* — 2002. — V. 277. — P. 6788–6798.
44. *Esmon C. T.* The regulation of natural anticoagulant pathways // *Science.* — 1987. — V. 235, N 4794. — P. 1348–1352.
45. *Esmon C. T.* The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation // *J. Biol. Chem.* — 1989. — V. 264. — P. 4743–4746.
46. *Rigby A. C., Grant M. A.* Protein S: a conduit between anticoagulation and inflammation // *Crit. Care Med.* — 2004. — V. 32. — P. 336–341.
47. *Rezende S. M., Simmonds R. E., Lane D. A.* Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex // *Blood.* — 2004. — V. 103. — P. 1192–1201.
48. *Adams T. E., Hockin M. F., Mann K. G., Everse S. J. T. E.* The crystal structure of activated protein C-inactivated bovine factor Va: Implications for cofactor function // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — V. 101. — P. 8918–8923.
49. *Dahlbäck B., Villoutreix B. O.* Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway // *J. Thromb. Haemost.* — 2003. — P. 1525–1534.
50. *Saller F., Villoutreix B. O., Amelot A. et al.* The gamma-carboxyglutamic acid domain of anticoagulant protein S is involved in activated protein C cofactor activity, independently of phospholipid binding // *Blood.* — 2005. — V. 105. — P. 122–130.
51. *Anderson H. A., Maylock C. A., Williams J. A. et al.* Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells // *Nat. Immunol.* — 2003. — V. 4. — P. 87–91.
52. *Van de Wouwer M., Conway E. M.* Thrombomodulin-Protein C-EPCR System. Integrated to Regulate Coagulation and Inflammation // *Crit. Care Med.* — 2004. — V. 32. — P. 254–261.
53. *Van de Wouwer M., Collen D., Conway E. M.* Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2004. — P. 1374–1383.
54. *Levi M.* Current understanding of disseminated intravascular coagulation // *Br. J. Haematol.* — 2004. — V. 124. — P. 567–576.
55. *Riewald M., Ruf W.* Science review: Role of coagulation protease cascades in sepsis // *Crit. Care.* — 2003. — V. 7. — P. 123–129.
56. *Levi M., de Jonge E., van der Poll T.* New treatment strategies for disseminated

- intravascular coagulation based on current understanding of the pathophysiology // *Ann. Med.* — 2004. — V. 36. — P. 41–49.
57. *Riewald M., Petrovan R. J., Donner A. et al.* Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway // *Science.* — 2002. — V. 296. — P. 1880–1882.
  58. *Webb J. H., Blom A. M., Dahlback B.* Vitamin K-Dependent Protein S Localizing Complement Regulator C4b-Binding Protein to the Surface of Apoptotic Cells // *J. Immunol.* — 2002. — V. 169. — P. 2580–2586.
  59. *Carter W. J., Myles T., Gibbs C. S. et al.* Crystal Structure of Anticoagulant Thrombin Variant E217K Provides Insights into Thrombin Allostery // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279, N 25. — P. 26387–26394.
  60. *Wells C. M., Di Cera E.* Thrombin is a Na<sup>+</sup>-activated enzyme // *Biochemistry.* — 1992. — V. 31, N 47. — P. 11721–11730.
  61. *Zhang E., Tulinsky A.* The molecular environment of the Na<sup>+</sup> binding site of thrombin // *Biophys. Chem.* — 1997. — V. 63. — P. 185–200.
  62. *Di Cera E., Guinto E. R., Vindigni A. et al.* The Na<sup>+</sup> binding site of thrombin // *J. Biol. Chem.* — 1995. — V. 270, N 38. — P. 22089–22092.
  63. *Parry M. A., Stone S. R., Hofsteenge J. et al.* Evidence for common structural changes in thrombin induced by active-site or exosite-binding // *Biochem. J.* — 1993. — V. 290, N 3. — P. 665–670.
  64. *Pineda A. O., Chen Z. W., Caccia S. et al.* The Anticoagulant Thrombin Mutant W215A/E217A Has a Collapsed Primary Specificity Pocket // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279, N 38. — P. 39824–39828.
  65. *Hall S. W., Gibbs C. S., Leung L. L.* Strategies for development of novel antithrombotics: modulating thrombin's procoagulant and anticoagulant properties // *Cell. Mol. Life Sci.* — 1997. — V. 53. — P. 731–736.
  66. *Huntington J. A., Esmon C. T.* molecular basis of thrombin allostery revealed by a 1.8 Å structure of the slow form // *Structure.* — 2003. — V. 11. — P. 469–479.
  67. *Gibbs C. S., Coutre S. E., Tsiang M. et al.* Conversion of thrombin into an anticoagulant by protein engineering // *Nature.* — 1995. — V. 378. — P. 413–416.
  68. *Tsiang M., Paborsky L. R., Li W. X. et al.* Protein engineering thrombin for optimal specificity and potency of anticoagulant activity in vivo // *Biochemistry.* — 1996. — V. 35, N 51. — P. 16449–16457.
  69. *Cantwell A. M., Di Cera E.* Rational design of a potent anticoagulant thrombin // *J. Biol. Chem.* — 2000. — V. 275, N 51. — P. 39827–39830.
  70. *Di Cera E., Cantwell A. M.* Determinants of Thrombin Specificity // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2001. — V. 936. — P. 133–146.
  71. *Gruber A., Cantwell A. M., Di Cera E. et al.* The Thrombin Mutant W215A/E217A Shows Safe and Potent Anticoagulant and Antithrombotic Effects in Vivo // *J. Biol. Chem.* — 2002. — V. 277, N 31. — P. 27581–27584.
  72. *Guinto E. R., Caccia S., Rose T. et al.* Unexpected crucial role of residue 225 in serine proteases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1999. — V. 96, N 5. — P. 1852–1857.
  73. *Szabo E., Venekei I., Bocskei Z. et al.* Three dimensional structures of S189D chymotrypsin and D189S trypsin mutants: The effect of polarity at site 189 on a protease-specific stabilization of the substrate binding site // *J. Mol. Biol.* — 2003. — V. 331, N 5. — P. 1121–1130.
  74. *Lai M. T., Di Cera E., Shafer J. A.* Kinetic pathway for the slow to fast transition of thrombin. Evidence of linked ligand binding at structurally distinct domains // *J. Biol. Chem.* — 1997. — V. 272. — P. 30275–30282.
  75. *Pineda A. O., Savvides S., Waksman G., Di Cera E.* Crystal Structure of the Anticoagulant Slow Form of Thrombin // *Ibid.* — 2002. — V. 277, N 43. — P. 40177–40180.
  76. *Pineda A. O., Carrel Ch., Bush L. et al.* Molecular Dissection of Na<sup>+</sup> Binding to Thrombin // *Ibid.* — 2004. — V. 279, N 30. — P. 31842–31853.
  77. *Prasad S., Wright K. J., Banerjee R. D.* Redesigning the monovalent cation specificity of an enzyme // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* — 2003. — V. 100, N 24. — P. 13785–13790.
  78. *Guinto E. R., Di Cera E.* Large heat capacity change in a protein-monovalent cation interaction // *Biochemistry.* — 1996. — V. 35, N 27. — P. 8800–8804.
  79. *Morais-Cabral J. H., Zhou T., MacKinnon R.* Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter. // *Nature.* — 2001. — V. 414, N 6859. — P. 3742–3748.
  80. *Henriksen R. A., Dunham C. K., Miller L. D. et al.* Prothrombin Greenville, Arg<sup>517</sup>-Gln, Identified in an Individual Heterozygous for Dysprothrombinemia // *Blood.* — 1998. — V. 91, N 6. — P. 2026–2031.
  81. *Ayala Y., Di Cera E.* Molecular recognition by thrombin. Role of the slow-fast transition, site-specific ion binding energetics and thermodynamic mapping of structural components // *J. Mol. Biol.* — 1994. — V. 235, N 2. — P. 733–746.
  82. *Pineda A. O., Cantwell A. M., Bush L. A. et al.* Molecular mapping of thrombin-receptor interactions // *J. Biol. Chem.* — 2002. — V. 277, N 34. — P. 32015–32019.

83. Greenspan N. S., Di Cera E. Defining epitopes: It's not as easy as it seems // *Nat. Biotechnol.* — 1999. — V. 17, N 10. — P. 736–737.
84. Clackson T., Wells J. A. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface // *Science.* — 1995. — V. 267, N 5196. — P. 383–386.
85. Schreiber G., Fersht A. R. Energetics of protein-protein interactions: analysis of the barnase-barstar interface by single mutations and double mutant cycles // *J. Mol. Biol.* — 1995. — V. 248, N 2. — P. 478–486.
86. Sun W. Y., Smirnow D., Jenkins M. L. et al. Prothrombin Scranton: substitution of an amino acid residue involved in the binding of Na<sup>+</sup> (LYS-556 to THR) leads to dysprothrombinemia // *Thromb. Haemost.* — 2001. — V. 85, N 4. — P. 651–654.
87. Perona J. J., Craik C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases // *Protein Sci.* — 1995. — V. 4, N 3. — P. 337–360.
88. Di Cera E. Site-specific analysis of mutational effects in proteins // *Adv. Protein Chem.* — 1998. — V. 51. — P. 59–113.
89. Griffon N., Di Stasio E. Thermodynamics of Na<sup>+</sup> binding to coagulation serine proteases // *Biophys. Chem.* — 2001. — V. 90, N 1. — P. 89–96.
90. Zhang E., Tulinsky A. The molecular environment of the Na<sup>+</sup> binding site of thrombin // *Ibid.* — 1997. — V. 63, N 2–3. — P. 185–200.
91. Arosio D., Ayala Y. M., Di Cera E. Mutation of W215 compromises thrombin cleavage of fibrinogen, but not of PAR-1 or protein C // *Biochemistry.* — 2000. — V. 39. — P. 8095–8101.
92. Di Cera E. Anticoagulant thrombins // *Trends. Cardiovasc. Med.* — 1998. — V. 8. — P. 340–350.
93. Vijayalakshmi J., Pabmanabhan K. P., Mann K. G. et al. The isomorphous structures of prethrombin2, hirugen-, and PPACK-thrombin: changes accompanying activation and exosite binding to thrombin // *Protein Sci.* — 1994. — V. 3. — P. 2254–2271.
94. Edwards P. D., Mauger R. C., Cottrell K. M. et al. Crystal Structure of anticoagulant thrombin variant E217K provides insight into thrombin allostery // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* — 2000. — V. 10. — P. 2291–2294.
95. Wang E. C., Hung S. H., Cahoon M., Hedstrom L. The role of the Cys191-Cys220 disulfide bond in trypsin: new targets for engineering substrate specificity // *Protein Eng.* — 1997. — V. 10. — P. 405–411.
96. Varallyay E., Lengyel Z., Graf L., Szilagyi L. The role of disulfide bond C191–C220 in trypsin and chymotrypsin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1997 — V. 230. — P. 592–596.
97. Bush-Pelc L., Marino F., Chen Z., et al. Important Role of the Cys-191 Cys-220 Disulfide Bond in Thrombin Function and Allostery // *J. Biol. Chem.* — 2007. — V. 282, N 37. — P. 27165–27170.
98. Xu H., Bush J. A., Pineda A. O. et al. Thrombomodulin changes the molecular ... between thrombin and protein C // *Ibid.* — 2005. — V. 280. — P. 7956–7961.
99. Di Cera E., Page M. J., Bah A. et al. Thrombin allostery // *Chem. Phys.* — 2007. — V. 9. — P. 1292–1306.
100. Bah A., Garvey L. C., Ge J., Di Cera E. Rapid Kinetics of Na<sup>+</sup> Binding to Thrombin // *J. Biol. Chem.* — 2006. — V. 281. — P. 40049–40056.
101. Silva F. P., Antunes O. A., de Alencastro R. B., de Simone S. G. The Na<sup>+</sup> binding channel of human coagulation proteases: Novel insights on the structure and allosteric modulation revealed by molecular surface analysis // *Biophys. Chem.* — 2006. — V. 119. — P. 282–294.
102. Pineda A. O., Chen Z. W., Bah A. et al. Crystal structure of thrombin in a self-inhibited conformation // *J. Biol. Chem.* — 2006. — V. 281. — P. 32922–32928.

**РЕКОМБІНАНТНА АНТИКОАГУЛЯНТНА  
ФОРМА  $\alpha$ -ТРОМБІНУ ЛЮДИНИ**

*М. В. Колодзейська  
В. І. Грищук  
Т. М. Чернишенко  
Е. І. Юсова  
Т. В. Гриненко*

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України, Київ

*E-mail: bio.cherv@gmail.com*

В огляді розглянуто мутантні форми тромбіну, які спричинюють істотні зміни геометрії активного центру, блокування субсайтів зв'язування субстратів, що розташовані в окремих петлях молекули ензиму, що зумовлює зміну конформаційної рухомості молекули і, отже, активності ензиму.

Питання алостерії тромбіну є важливим для ідентифікації взаємозв'язку між його структурою і функціями тромбіну, а також для розвитку нового напрямку в терапії.

**Ключові слова:** рекомбінантний тромбін, алостерія, мутагенез, протеїн С, тромбомодулін, антикоагулянтна функція.

**RECOMBINANT ANTICOAGULANT FORM  
OF A HUMAN  $\alpha$ -THROMBIN**

*M. V. Kolodzejskaja  
V. I. Grishchuk  
T. M. Chernyshenko  
E. I. Jusova  
T. V. Grinenko*

Palladin Institute of Biochemistry  
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

*E-mail: bio.cherv@gmail.com*

Mutant thrombin forms that cause essential changes of an active center geometry, blocking of the subsites of the substrata linkage located in separate loops of a molecule of enzyme that results in change of conformational mobility of a molecule and hence an increased activity of enzyme are discussed in the review.

Question concerning thrombin allostery is important for identification of interrelation between its structure and thrombin functions and also for development of a new direction in therapy.

**Key words:** recombinant thrombin, allostery, mutagenesis, protein C, thrombomodulin, anti-coagulant function.