

*На правах рукописи*



Колядко Владимир Николаевич

МЕХАНИЗМЫ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ  
КОНТАКТНОГО ПУТИ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ  
КАНОНИЧЕСКИМИ ИНГИБИТОРАМИ

Специальность 03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» Российской академии наук

Научный руководитель: **Пантелеев Михаил Александрович**  
доктор физико-математических наук

Официальные оппоненты: **Рощупкин Дмитрий Иванович**  
доктор биологических наук,  
профессор кафедры общей и медицинской биофизики медико-биологического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава РФ

**Маевский Евгений Ильич**  
доктор медицинских наук, профессор,  
заведующий лабораторией энергетики биологических систем ФГБУН Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Защита диссертации состоится «19» апреля 2017 года в 13 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, 4.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, 38, и на сайте <http://ibcp.chph.ras.ru/diss-socket/razmeshchennye-dissertatsii>

Автореферат разослан «    » февраля 2017 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета,  
кандидат химических наук



Мазалецкая Л.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Система свертывания крови защищает организм от кровопотери при повреждении сосудов и включает в себя тромбоциты, агрегирующие в месте повреждения, и плазменное звено, состоящее из сериновых протеаз-факторов свертывания. Реакции плазменного свертывания запускаются по пути тканевого фактора (ТФ), они приводят к наработке ключевой протеазы тромбина и к образованию нерастворимого фибринового сгустка [Mann et al. 1990]. При контакте крови с отрицательно заряженной чужеродной поверхностью бактерий, пробирок и катетеров свертывание запускается также по контактному пути в результате автоактивации на этой поверхности фактора XIIa (фXIIa) [Schmaier, 2008]. Фактор XIIa, не участвуя в нормальном гемостазе, может способствовать развитию тромбоза [Renné et al. 2005] в ходе контактной активации на поверхности тромбоцитов, экспонирующих отрицательно заряженный фосфатидилсерин (ФС) [Zakharova et al. 2015], появление которых регулируется трансклутаминовой активностью [Dale et al. 2002]. Предотвращение контактной активации на тромбоцитах или прямое ингибирование фXIIa может оказаться перспективным для безопасного лечения тромбозов.

Среди полусотни известных ингибиторов фXIIa абсолютное большинство имеет низкую активность и малую избирательность к фXIIa относительно других протеаз свертывания. Наибольшей ингибирующей активностью против фXIIa обладает инфестин-4, выделенный из кровососущего насекомого *Triatoma infestans* [Campos et al. 2004], а также ингибиторы трипсина из семян кукурузы (КТИ) [Hojima et al. 1980], тыквы (СМТИ-III) и огурца (LCTI-III) [Hayashi et al. 1994]. Для них константы ингибирования фXIIa составляют от 0,1 до 10 нМ и более, а селективность либо является крайне низкой (порядка 10 – 100), либо остается малоизученной. Плохо изученным является и влияние этих ингибиторов на динамику свертывания.

Указанные ингибиторы фXIIa относятся к классу канонических, которые состоят из 20 – 80 аминокислотных остатков (а.о.) и имеют гибкую протеаза-

связывающую петлю и жесткий «остов», скрепленный дисульфидными мостиками. Считается, что взаимодействие петли ингибитора с каталитическим карманом протеазы определяет ингибирующую активность [Otlewski et al. 2005]. При образовании комплекса с протеазой петля ингибитора принимает строго определенную, «каноническую» конформацию. Такая конформация стабилизируется взаимодействиями между остатками петли и остова, а внесение мутаций, усиливающих эти взаимодействия внутри ингибитора, часто приводит к увеличению ингибирующей активности против целевой протеазы [Swedberg et al. 2011]. Однако, малоизученными остаются механизмы, которые определяют селективность к целевой протеазе относительно других протеаз. Разрешение этого вопроса позволило бы разработать стратегию поиска новых ингибиторов с заданными свойствами.

Целью данной работы было исследование механизмов избирательного ингибирования контактного пути свертывания каноническими ингибиторами фактора XIIa.

В задачи исследования входило:

1. Определить селективность ингибирования факторов XIIa, XIa и калликрейна прямыми каноническими ингибиторами: инфестином-4, ингибиторами трипсина из кукурузы, огурца и тыквы;
2. Внести мутации в протеаза-связывающую петлю инфестина-4 для изучения ее роли в избирательности ингибирования фактора XIIa;
3. Исследовать специфичность действия мутантов инфестина-4 на контактный путь свертывания, активированный в плазме крови без участия тромбоцитов;
4. Определить взаимодействия мутантов инфестина-4 с протеазами свертывания (фXIIa, фХа).

Научная новизна. В работе определена селективность ингибирования фXIIa наиболее активными каноническими ингибиторами: инфестином-4 и КТИ. Измерением остаточной активности очищенных протеаз в присутствии

ингибиторов показано, что инфестин-4 обладает неспецифической ингибирующей активностью против пламина и факторов Ха, IXa, VIIa, в то время как КТИ – против фактора XIa и активного протеина С. Сайт-направленным мутагенезом произведены аминокислотные замены в протеаза-связывающей петле инфестина-4, приводящие к уменьшению неспецифической активности против пламина, фХа, фIXa, фVIIa и к увеличению селективности ингибирования фXIIa на 2 порядка величины.

Также экспериментально показано, что Мутант В инфестина-4 является конкурентным ингибитором фXIIa. На основании полученных результатов предположено, что ингибирующая активность вариантов инфестина-4 против фXIIa может определяться нековалентными взаимодействиями как с каталитическим карманом фXIIa, так и с автолитической петлей протеазы. Причем отсутствие неспецифической активности мутантов инфестина-4 против фХа может быть вызвано непродуктивными взаимодействиями с каталитическими остатками фХа.

Экспериментальным исследованием динамики свертывания установлено, что селективные ингибиторы фXIIa в плазме крови специфически блокируют контактный путь и не влияют на свертывание по пути тканевого фактора. С использованием проточной цитометрии очищенных тромбоцитов показано, что формирование тромбоцитов, которые при стимуляции экспонируют фосфатидилсерин и могут активировать контактный путь, блокируется ингибиторами трансглутаминазной активности.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы проясняют механизмы избирательного связывания ингибитора с целевой протеазой и способствуют созданию новых высокоселективных ингибиторов фXIIa, которые могут стать основой для безопасного лечения и профилактики тромботических состояний. Предложенные в работе новые варианты инфестина-4, специфически блокирующие контактный путь, могут быть использованы при создании новых методов хранения и исследования крови, например, для улучшения качества забора крови и для повышения

чувствительности диагностических тестов гемостаза к патологическим состояниям. Также полученные результаты показывают, что формирование прокоагулянтной поверхности тромбоцитов предотвращается конкурентными ингибиторами трансглутаминазной активности, и вносят вклад в понимание взаимосвязи между контактным путем свертывания и тромбоцитами.

Методология и методы исследования. Для исследования свойств ингибиторов фактора XIIa использованы методы молекулярной биологии и биохимии. Для оценки влияния ингибиторов на свертывание использованы современные биофизические методы исследования генерации тромбина, тромбоэластографии и тромбодинамики. Структурные черты ингибиторов исследованы с помощью адекватных методов молекулярной динамики. Анализ популяций тромбоцитов проведен методом проточной цитометрии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Инфестин-4 является наиболее активным ингибитором фXIIa среди рассмотренных; КТИ при этом является наиболее селективным ингибитором.
2. Мутации, внесенные в протеаза-связывающую петлю инфестина-4, привели к увеличению селективности по отношению к фXIIa.
3. Мутант В инфестина-4, конкурентно ингибирующий фXIIa ( $K_i$  0,7 нМ), дозо-зависимо ингибирует генерацию тромбина и задерживает образование сгустка фибрина при активации по контактному пути, не влияя на динамику свертывания по пути тканевого фактора.
4. Избирательность ингибирования фXIIa вариантами инфестина-4, находящимися в канонической конформации, может быть обусловлена «непродуктивным» связыванием с нецелевыми протеазами, при котором затруднен стандартный механизм ингибирования.

Личный вклад автора заключается в непосредственном планировании и выполнении экспериментальной работы, анализе полученных результатов и литературных данных, подготовке публикаций и написании диссертации.

Степень достоверности результатов. Достоверность полученных в работе результатов обеспечивается использованием необходимых современных

методов, применяющихся повсеместно в такого рода исследованиях, для получения и исследования функциональных и структурных характеристик ингибиторов. Исследования плазменного и тромбоцитарного звена свертывания проведены с использованием как традиционных, так и современных биофизических методов; при этом полученные результаты согласуются с литературными данными.

Апробация результатов. Результаты работы представлены на следующих конференциях: XXIII Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis (23 – 28 июля 2011, Киото, Япония), II Конгресс гематологов России (17 – 19 апреля 2014, Москва, Россия), XXVII International Symposium on Technological Innovations in Laboratory Hematology (15 – 17 мая 2014, Гаага, Нидерланды), 60<sup>th</sup> Annual Meeting of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH (22 – 26 июня 2014, Милуоки, США).

Публикации. По материалам диссертации получено 2 патента, опубликовано 5 статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ и включенных в базу цитирования Web of Science, и тезисы 4 докладов на российских и международных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация содержит 4 главы и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, благодарностей и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 135 страницах, содержит 44 рисунка и 12 таблиц. Список литературы содержит 186 источников.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### **Материалы и методы**

#### Получение канонических ингибиторов фХIIa

Ген инфестина-4 (Inf4), кодирующий 56 а.о., синтезировали из 5 олигонуклеотидов с комплементарными 3'-концами, после чего клонировали его в вектор рЕТ32a (GenBank KJ183178). Аминокислотные замены в петле белка вносили с использованием 2 пар праймеров, соответствовавших участку

петли и включавших вносимые мутации. В результате были созданы гены Мутанта 15 (GenBank KJ183179), Мутанта А (GenBank KJ183180), Мутанта В (GenBank KJ183181) и Мутанта С (GenBank KJ183182), клонированные в рЕТ32-Inf4 и трансформированные в штамм *Escherichia coli* BL21(DE3). Inf4 или его мутанты экспрессировались в виде слитых белков с тиоредоксином (Trx) массой 26 кДа. Нарботанный целевой белок выделяли из клеточного лизата никель-хелатной и анион-обменной хроматографией. Конечный выход рекомбинантных вариантов Inf4 составлял 20 – 50 мг с литра культуры.

Рекомбинантный ингибитор трипсина из тыквы *Cucurbita maxima* (СМТИ-III, 29 а.о.) был экспрессирован в виде слитого белка с доменом В1 протеина *G Streptococcus sp.* (GB1) (GenBank KJ183183). Ген белка GB1-СМТИ-III был синтезирован путем отжига 4 олигонуклеотидов, частично комплементарных друг другу, и их последующего достраивания. Ген клонировали в вектор рЕТ28а и полученную плазмиду р28FuСМТИ трансформировали в *E. coli* BL21 (DE3). После индукции в течение ночи при 18 °С, экспрессированный белок был очищен никель-хелатной хроматографией. Его аналог, ингибитор трипсина из огурца *Luffa cylindrica* (LСТИ-III, 29 а.о.), получен химическим синтезом. Кукурузный ингибитор трипсина (КТИ, 109 а.о.) был выделен и очищен аффинной хроматографией из зерен кукурузы в Институте белка РАН.

#### Измерение констант ингибирования в хромогенном тесте

Для определения констант ингибирования факторов XIIa, XIa, IXa, VIIa, Ха, тромбина, активного протеина С, плазменного калликреина, плазмина или тканевого активатора плазминогена, протеазу инкубировали с различными концентрациями ингибитора (инфестина-4 или его мутантов, КТИ, СМТИ-III, LСТИ-III), добавляли хромогенный субстрат протеазы и по поглощению на 405 нм измеряли кинетику наработки продукта, р-нитроанилина. Начальная скорость гидролиза субстрата нормировалась на значение при нулевой концентрации ингибитора и откладывалась против концентрации ингибитора. Константу ингибирования,  $K_i$ , вычисляли по уравнению Ченга-Пруссоффа.



## Оценка эффективности ингибирования контактного пути в плазме или крови

Для получения пула плазмы, кровь, взятую с информированного согласия здоровых доноров, собирали в пробирки с цитратом натрия и дважды центрифугировали для получения свободной от тромбоцитов плазмы. Пул замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  для хранения перед экспериментом.

Активность ингибиторов фХIIа против контактного пути оценивали по удлинению активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Плазму инкубировали с разными концентрациями ингибиторов, контактный путь активировали смесью каолина (мелкодисперсной глины) и фосфолипидов, а после добавления кальция измеряли время свертывания в кювете коагулометра. Эффективной концентрацией ингибитора считалась такая, при которой АЧТВ увеличено в 3 раза по сравнению с контролем (45 с).

Влияние ингибиторов на свертывание оценивали по степени ингибирования генерации тромбина. В плазму с ингибитором добавляли флуорогенный субстрат тромбина Z-Gly-Gly-Arg-аминометилкумарин (АМС), а также активирующую смесь, содержащую кальций, фосфолипиды и либо каолин (100-кратное разведение относительно АЧТВ-теста), либо ТФ (5 пМ). На планшетном флуориметре измерялась кинетика отщепления метки АМС (длины волн возбуждения 355 нм и эмиссии 460 нм) параллельно с сигналом в контрольных лунках, содержавших плазму с растворителем белка (30 мМ HEPES; pH 7,4) или с АМС (8 мкМ). Кривую генерации тромбина получали путем вычитания фона, преобразования сигнала в концентрацию метки и дифференцировки кривой наработки АМС.

Для опыта в цельной крови ее забирали без цитрата, сразу после чего смешивали с Мутантом В, КТИ или растворителем. При вращении (10 об./мин) пробирок с кровью визуально фиксировался момент образования сгустка. Для каждого из 3 доноров сделано не менее 2 повторов в каждой группе образцов.

## Исследование динамики роста сгустка

Влияние ингибиторов фХIIа на пространственный рост фибринового сгустка изучали при исследовании тромбодинамики [Dashkevich et al. 2012].

Для этого плазму инкубировали с ингибитором (15 мин, 37 °С), восполняли в ней свободную концентрацию кальция (2 мМ) и помещали ее в кювету, в которой активировали рост сгустка ТФ, иммобилизованным на поверхности вставки-активатора. По светорассеянию регистрировали фронтальный рост фибринового сгустка от активатора в объем плазмы. На графике размер сгустка в направлении роста, мкм, откладывали против времени, мин.

#### Молекулярная динамика ингибиторов и белок-белковый докинг с протеазами

Данная часть работы выполнялась совместно с к.х.н. С.В. Луцкиной (с.н.с. Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН). Модели ингибиторов были построены по кристаллическим структурам инфестина-4 (PDB ID: 2ERW) и СМТИ-I (PDB ID: 1LU0), в которых были произведены замены аминокислот для получения последовательностей мутантов инфестина-4 и СМТИ-III, соответственно. Молекулы воды TIP3P и ионы Na<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> (150 мМ) были добавлены до формирования ячейки в форме прямоугольного параллелепипеда. Моделирование молекулярной динамики в течение 150 нс при 300 К в силовом поле CHARMM36, NPT ансамбль, при периодических граничных условиях производилось на суперкомпьютере «Ломоносов» с помощью пакета NAMD 2.9. Модель каждого ингибитора для последующего белок-белкового докинга с протеазой получали постепенным снижением температуры системы до 4 К в течение 30 нс.

Структура фХIIa была построена ранее по гомологии (47 %) с активатором фактора роста гепатоцитов (PDB ID: 2R0L), т.к. структура фХIIa в активной конформации пока не разрешена. Также была использована структура фХа (2JKH). Белок-белковый докинг проводили при помощи сервисов ClusPro, pyDock и Rosetta.

#### Формирование прокоагулянтных тромбоцитов при их стимуляции

Тромбоциты очищались из плазмы доноров, богатой тромбоцитами и дополнительно содержащей простагландин E1 и апиразу, путем нанесения плазмы на гель-фильтрационную колонку с Сефарозой CL-2B. Стимуляция

выделенных тромбоцитов производилась тромбином и/или активатором коллагенового рецептора (конвульксином или коллаген-подобным пептидом); при инкубации со стимулятором добавляли тканевую трансглутаминазу (тТГ) и ее ингибиторы (цистамин, ГТФ, T101) или субстрат (серотонин), а также метки: фикоэритрин-меченый аннексин V, который связывается с ФС, и флуоресцеин-меченое антитело к фибриногену. После стимуляции, при помощи проточной цитофлуорометрии измеряли долю тромбоцитов, на поверхности которых появился ФС (такие тромбоциты считаются прокоагулянтными), а также измеряли относительную флуоресценцию антитела к фибриногену на этих тромбоцитах (относительно контрольного образца со стимулятором и без тТГ и ее ингибиторов).

### Статистический анализ

Анализ и визуализация данных производились в программном пакете OriginPro 6.0. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение (SD) по меньшей мере 3 измерений, если не оговорено иное. При измерении времени свертывания в цельной крови без антикоагулянта разницу между группами оценивали с помощью рангового критерия Вилкоксона.

## **Результаты и обсуждение**

### Селективность ингибирования фХIIа каноническими ингибиторами

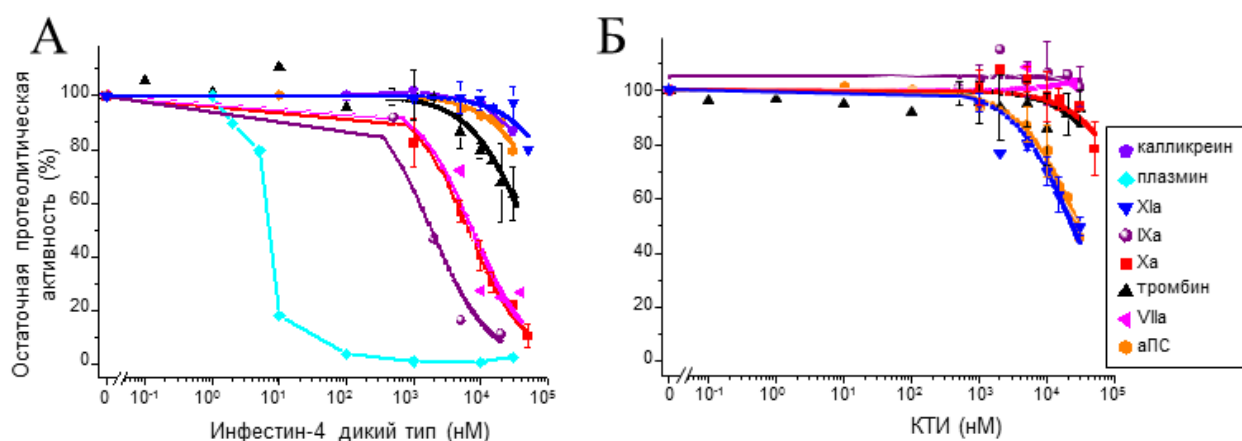
В работе были исследованы 4 наиболее активных ингибитора фХIIа: инфестин-4, ингибиторы трипсина из кукурузы (КТИ), тыквы (СМТИ-III) и огурца (ЛСТИ-III). Ингибирующая активность против фХIIа была определена в хромогенном тесте по уменьшению скорости расщепления хромогенного субстрата S-2302. Инфестин-4 оказался самым активным, с константой ингибирования  $K_i$   $0,113 \pm 0,023$  нМ, КТИ был в 4 раза менее активным; СМТИ-III и ЛСТИ-III были относительно слабыми ингибиторами с константами 10 нМ и выше (Таблица 1). Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными [Campos et al. 2004; Baeriswyl et al. 2015; Hayashi et al. 1994].

Также была определена ингибирующая активность инфестина-4 и КТИ против других сериновых протеаз: факторов XIa, IXa, VIIa, Xa, тромбина, активного протеина С (аПС), плазменного калликреина, плазмина, тканевого активатора плазминогена (Рисунок 1). Инфестин-4 ингибировал плазмин ( $K_i$   $4,7 \pm 1,5$  нМ), факторы Xa ( $2,43 \pm 0,87$  мкМ), IXa ( $1,06 \pm 0,25$  мкМ), VIIa ( $4,7 \pm 1,7$  мкМ) и тромбин ( $33,4 \pm 9,4$  мкМ), а КТИ ингибировал XIa ( $15,4 \pm 2,6$  мкМ) и аПС ( $15,9 \pm 3,8$  мкМ). Если определить селективность как отношение наименьшей константы ингибирования нецелевой протеазы к константе ингибирования фХIIa, то селективность инфестина-4 составляет около 40, а КТИ –  $40 \times 10^3$ .

**Таблица 1.** Ингибирование фХIIa и контактной активации свертывания инфестином-4, его мутантами и другими каноническими ингибиторами: КТИ, LCTI-III и CMTI-III

Ингибитор	Последовательность петли P <sup>2</sup> – P <sup>4</sup>	Константа ингибирования фХIIa, нМ	Концентрация 3-крат. удлинения АЧТВ, мкМ	Оценочная функция докинга, у.е.
КТИ	PRLPWP	0,41 ± 0,10	8,5 ± 1,6	-1267
LCTI-III	PRILME	9,8 ± 2,2	35 ± 4	-1000
CMTI-III	PRILMK	21,8 ± 4,8	29,7 ± 2,2	-972
Инфестин-4	FRNYVP	0,113 ± 0,023	19 ± 4	-1259
Мутант А	FRRFVA	3,7 ± 0,9	32,9 ± 0,7	-1180
Мутант В	TRNFVA	0,72 ± 0,17	19 ± 3	-1192
Мутант С	NRRYVP	10 ± 6	32 ± 2	-1055
Мутант 15	TRRFVA	1,02 ± 0,22	25,2 ± 1,5	-1183

Показаны: остатки в позициях P<sup>2</sup>–P<sup>4</sup> протеаза-связывающей петли ингибиторов; константы ингибирования  $K_i$ , нМ; концентрации ингибиторов  $CT_3$ , мкМ, приводящие к 3-кратному удлинению АЧТВ; безразмерные значения оценочной функции  $SF$ , полученные гибким белок-белковым докингом ингибиторов с модельной структурой фХIIa на сервере ClusPro. Значения констант представлены в виде среднего ± SD по 3 или более измерениям. [Kolyadko et al. 2015].



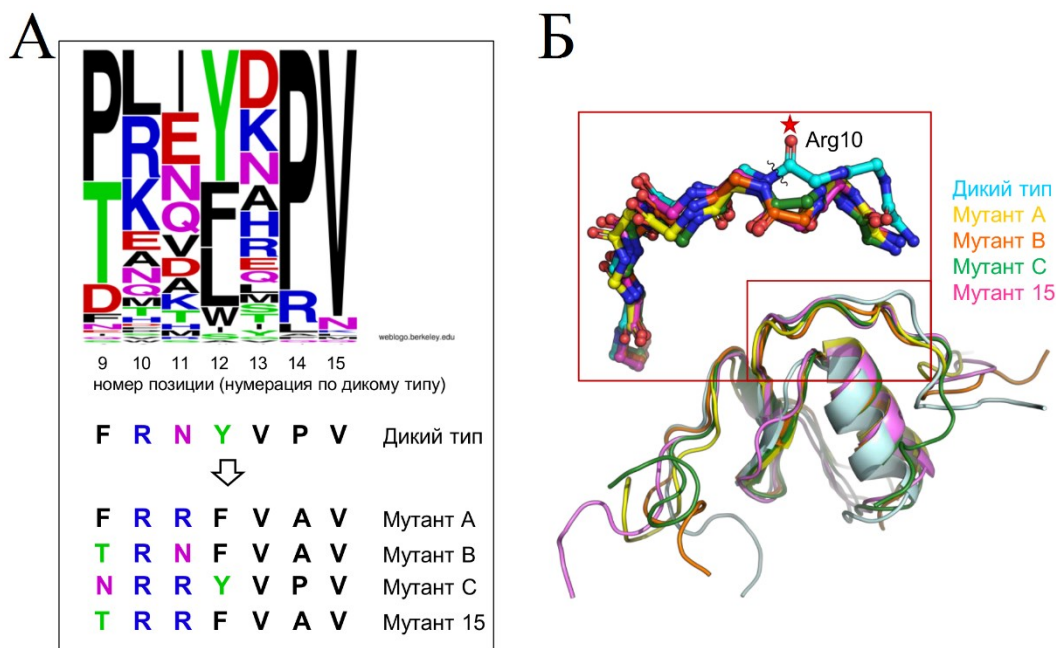
**Рисунок 1.** Неспецифическая активность ингибиторов фХIIа. На графиках отложена остаточная протеолитическая активность сериновых протеаз, связанных с системой свертывания, %, при различных концентрациях инфестина-4 (А) и КТИ (Б) (шкала концентраций в логарифмическом масштабе). [Kolyadko et al. 2015].

### Внесение мутаций в петлю инфестина-4 повысило селективность к фХIIа

Для изучения роли протеаза-связывающей петли в избирательности инфестина-4 были внесены мутации в этот участок ингибитора. Ранее был известен Мутант 15 инфестина-4, селективность которого к фХIIа была повышена по сравнению с диким типом [Campos et al. 2012]. Однако, ранее не был изучен механизм повышения селективности и не было исследовано влияние мутанта инфестина-4 на систему свертывания. Перед внесением мутаций проведено сравнение 89 последовательностей протеаза-связывающей петли ингибиторов, входящих в семейство Казала (к этому типу относится и инфестин-4). Как показано на диаграмме Web-logo, отражающей частоту появления аминокислотных остатков в данной позиции петли, в позиции P<sup>2</sup> (нумерация по [Schechter, Berger. 1967]) остаток Phe9 встречается крайне редко (только у инфестина-4 и пары других белков). Значительно чаще эта позиция занята остатком Thr, который, как известно, придает петле каноническую конформацию за счет водородных связей с остатком 11 в позиции P<sup>1</sup> [Apostoluk et al. 1998] (Рисунок 2А). Также был выявлен мотив Pro14 и Val15 в петле ингибиторов.

С учетом данного сравнения создано несколько новых мутантов инфестина-4, замены в петле которых являются промежуточными

относительно последовательностей петли дикого типа и Мутанта 15. Так, Phe9 был заменен на Thr или Asn, Asn11 – на Arg, Tyr12 и Pro14 – на Phe и Ala, соответственно. Arg10 в позиции P<sup>1</sup> был сохранен во всех мутантах, т.к. этот остаток отвечает за общую специфичность к трипсин-подобным протеазам. При помощи моделирования молекулярной динамики вариантов инфестина-4 в течение 150 нс было исследовано, как эти мутации могли повлиять на структуру ингибитора. Полученные структуры, наложенные друг на друга, показаны на Рисунке 2Б. В диком типе область петли вблизи расщепляемой связи P<sup>1</sup> Arg10 – P<sup>1'</sup> Asn11 отклонялась от канонической конформации, предположительно, из-за взаимодействия P<sup>2</sup> Phe9 и P<sup>1</sup> Arg10. Напротив, у всех мутантов была стабилизирована каноническая конформация петли, совпадающая с конформацией КТИ, LCTI-III и СМТИ-III, и были установлены взаимодействия между остатками P<sup>2</sup> и P<sup>1'</sup> (π-катионное взаимодействие в Мутанте А и водородные связи в Мутантах В, С и 15).



**Рисунок 2.** Структура мутантов инфестина-4, имеющих каноническую конформацию. **А:** Диаграмма Web-logo для участка петли 89 ингибиторов типа Казалья, ниже – участок петли мутантов инфестина-4. Нумерация по инфестину-4. **Б:** Наложение молекулярно динамических структур дикого типа инфестина-4 и его мутантов. На увеличенном изображении звездочкой отмечен карбонильный кислород остатка Arg10, волнистой линией – расщепляемая связь. [Kolyadko et al. 2015].

Чтобы определить влияние мутаций на ингибирующую активность инфестина-4, для всех мутантов были измерены константы ингибирования протеаз свертывания, а также были определены эффективные концентрации в плазме крови. Мутант В ингибировал фХIIa с  $K_i$   $0,72 \pm 0,17$  нМ; остальные мутанты были менее активными. Несмотря на 6-кратное увеличение  $K_i$  по сравнению с диким типом инфестина-4, Мутант В вызывал 3-кратное удлинение АЧТВ при такой же концентрации ( $19 \pm 3$  мкМ), как и дикий тип. Эффективные концентрации в плазме для других мутантов были выше, в диапазоне 25 – 33 мкМ (Таблица 1). Как и дикий тип, мутанты инфестина-4 не ингибировали фXIa, аПС, калликреин и тканевый активатор плазминогена. В отличие от дикого типа, ни один мутант не ингибировал фактор фХа, а их активность к плазмину была уменьшена в 500 и более раз по сравнению с диким типом. Вклад мутаций в активность против других протеаз был разнонаправленным: в отличие от дикого типа, Мутант В не ингибировал фVIIa и слабее ингибировал фIXa, однако был на порядок более активным по отношению к тромбину (Таблица 2). В целом, мутации привели к увеличению селективности; например, для Мутанта В она составила  $4 \times 10^3$ .

**Таблица 2.** Константы ингибирования, мкМ, протеаз свертывания мутантами инфестина-4

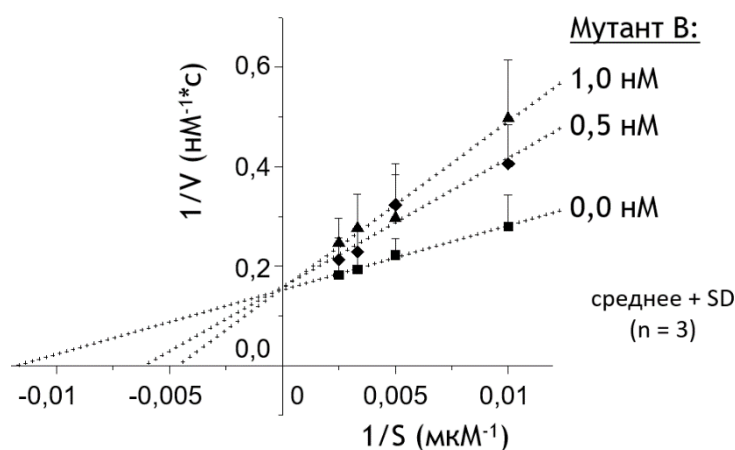
Ингибитор	фХа	Плазмин	Тромбин	фIXa	фVIIa
Инфестин-4	$2,43 \pm 0,87$	$0,0047 \pm 0,0015$	$33,4 \pm 9,4$	$1,06 \pm 0,25$	$4,7 \pm 1,7$
Мутант А	н.и.	$17,5 \pm 4,5$	н.и.	$0,32 \pm 0,14$	–
Мутант В	н.и.	$7,0 \pm 3,0$	$2,9 \pm 1,2$	$4,6 \pm 1,5$	н.и.
Мутант С	н.и.	$2,45 \pm 0,6$	$28,5 \pm 8,0$	$0,66 \pm 0,18$	–
Мутант 15	н.и.	$28 \pm 8$	н.и.	$1,33 \pm 0,44$	$1,9 \pm 0,7$

«н.и.» – не ингибирует при концентрациях вплоть до 40 мкМ. [Kolyadko et al. 2015].

### Межмолекулярные взаимодействия мутантов инфестина-4 с фХIIa и фХа

Чтобы прояснить, какой механизм может отвечать за повышение селективности к фХIIa при внесении мутаций в протеаза-связывающую петлю инфестина-4, были изучены структуры комплексов, которые могут

образовывать варианты инфестина-4 как с фХIIа, так и с нецелевой протеазой фХа. Во-первых, было показано, что Мутант В является конкурентным ингибитором фХIIа. Для этого была измерена скорость  $V$  расщепления фактором ХIIа различных концентраций субстрата  $S$  при добавлении 0; 0,5 или 1 нМ Мутанта В и был построен график Лайнуивера-Берка в обратных координатах (Рисунок 3). Для дикого типа инфестина-4 конкурентный механизм ингибирования был показан ранее [Xu et al. 2014]. Исходя из этого, было предположено, что взаимодействие вариантов инфестина-4 с фХIIа осуществляется через связывание протеаза-связывающей петли с каталитическим карманом.

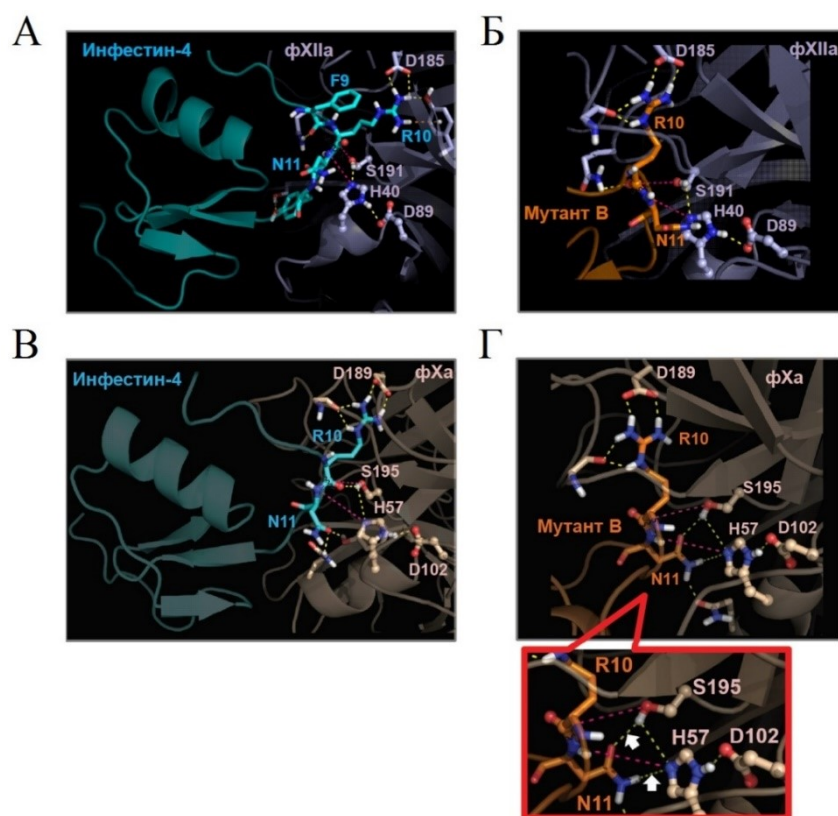


**Рисунок 3.** Конкурентный механизм ингибирования фХIIа Мутантом В. Измерялась скорость расщепления субстрата S-2302 (100; 200; 300; 400 мкМ) фактором ХIIа в присутствии трех концентраций ингибитора (0; 0,5; 1 нМ). Добавление ингибитора увеличивало эффективную константу Михаэлиса, но не изменяло наибольшую скорость. [Kolyadko et al. 2015].

При помощи гибкого белок-белкового докинга были проанализированы структуры комплексов с фХIIа и фХа. Во всех комплексах с фХIIа варианты инфестина-4 были расположены в корректном положении относительно триады Ser191-His40-Asp89. Такое положение, способствующее стандартному механизму ингибирования (на Рисунке 4 А,Б показано для дикого типа и Мутанта В), характеризуется образованием солевого мостика между R<sup>1</sup> остатком Arg10 и Arg185 S<sup>1</sup> кармана протеазы, а также близким (~3 Å) расположением С- и N-атомов расщепляемой пептидной связи относительно



каталитических Ser191 O<sup>γ</sup> и His40 N<sup>ε2</sup>, при котором может проходить нуклеофильная атака на связь [Radisky et al. 2002]. Как оказалось, оценочная функция докинга, пропорциональная вычисленной энергии связывания ингибитора с протеазой, отражала значения констант ингибирования фХПа вариантами инфестина-4 (Таблица 1). Поэтому активность изученных ингибиторов против фХПа может определяться нековалентными взаимодействиями с протеазой. Напротив, в комплексе мутантов с фХа остатки петли образовывали «непродуктивные» водородные взаимодействия с каталитическими остатками Ser195 и His57 фХа (Рисунок 4Г), в то время как дикий тип в кармане фХа был расположен корректно (Рисунок 4В). Возможно, взаимодействие с каталитическими остатками препятствует нуклеофильной атаке и нарушает стандартный механизм ингибирования, что объясняет понижение активности мутантов инфестина-4 против фХа.



**Рисунок 4.** Белок-белковые комплексы между протеазой, фХПа (А, Б; фиолетовый цвет) или фХа (В, Г; светло-коричневый), и ингибитором, дикий тип (А, В; бирюзовый цвет) или Мутант В (Б, Г; оранжевый). В виде палочек показаны каталитические остатки и некоторые остатки петли ингибиторов. Обозначения аминокислот однобуквенные. [Kolyadko et al. 2015].

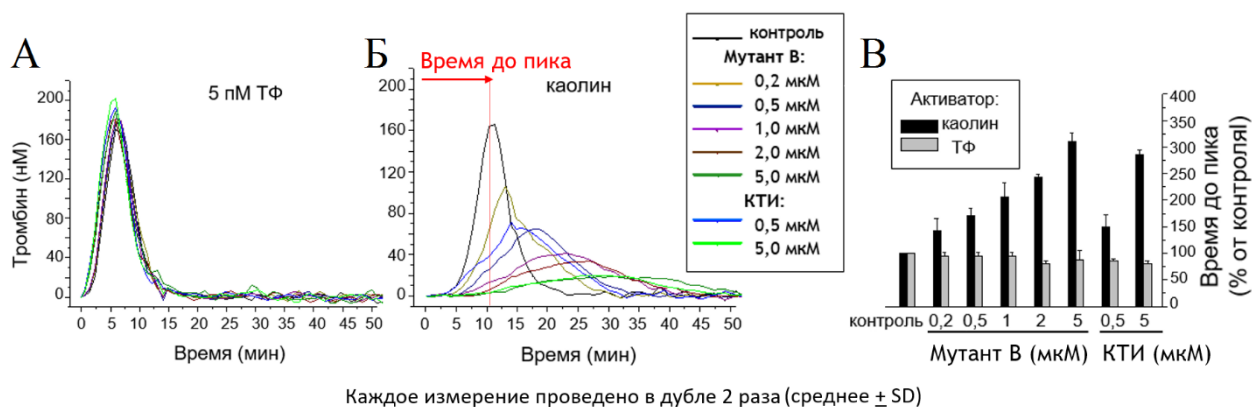
Кроме того, сравнением последовательности автолитической петли (этот участок располагается вблизи каталитического кармана и состоит из 14 – 21 а.о.) фХIIа с другими протеазами свертывания обнаружено, что в фХIIа эта петля имеет 3 остатка глутамата и суммарный отрицательный заряд (-3), в то время как у факторов XIа (+3), IXа (+3), Ха (+4), тромбина (+1) и аПС (+3) она заряжена положительно. Следовательно, связывание ингибиторов с автолитической петлей фХIIа может вносить вклад в избирательность ингибирования относительно других протеаз свертывания.

#### Мутант инфестина-4 специфически ингибирует контактный путь свертывания

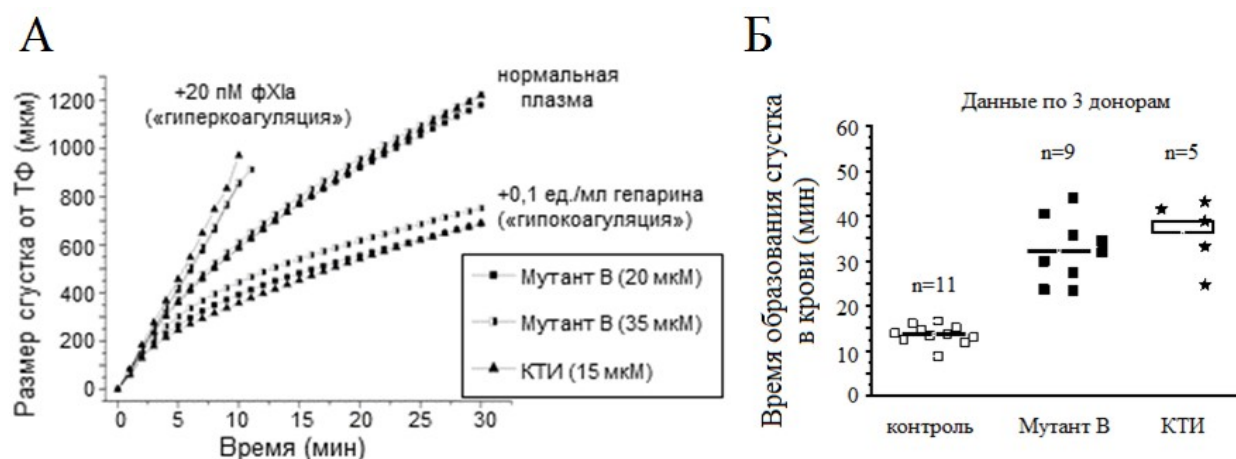
Для изучения влияния селективных ингибиторов фХIIа на систему свертывания крови были использованы так называемые «глобальные» тесты гемостаза. Так, была исследована кинетика генерации тромбина в гомогенной системе, в которой свертывание активировали по контактному пути или ТФ по внешнему пути. После добавления активатора в плазму, содержащую ингибитор фХIIа, происходила наработка активных факторов свертывания, в результате с задержкой по времени образовывался тромбин, который расщеплял флуорогенный субстрат. Тромбин достигал максимальной концентрации за время, называемое «время до пика», после чего его концентрация падала до нуля из-за действия плазменных ингибиторов свертывания (например, антитромбина). Когда генерация тромбина была активирована 5 пМ ТФ, ингибиторы фХIIа не оказывали влияния на кинетику процесса (Рисунок 5А). При активации по контактному пути Мутант В и КТИ дозо-зависимо, с эффективными концентрациями около 5 мкМ, задерживали генерацию тромбина и уменьшали ее амплитуду (Рисунок 5 Б,В). Аналогичный результат был получен ранее для дикого типа [Xu et al. 2014].

Также в плазме с ингибиторами фХIIа методом тромбодинамики была исследована динамика роста фибринового сгустка при активации ТФ, нанесенным на поверхность вставки. Для исследования использованы три вида плазмы: либо нормальная, либо с добавленным гепарином (модель гипокоагуляции), либо с фХIIа (модель гиперкоагуляции). Как показано на

Рисунке 6А, пространственный рост сгустка кардинально отличается для этих видов плазм и не зависит от конкретного ингибитора фХIIа. Данный результат соответствует тому, что при использовании селективных ингибиторов фХIIа лабораторные тесты гемостаза чувствительны к отклонениям системы свертывания от нормального состояния [Luddington et al. 2004].



**Рисунок 5.** Мутант В и КТИ специфически ингибируют генерацию тромбина по контактному пути. **А, Б:** Кривые генерации тромбина в плазме с растворителем (контроль) или различными концентрациями ингибиторов, при активации 5 пМ ТФ (**А**) или каолином (**Б**). **В:** Время достижения пика на кривой генерации при двух типах активации и при различных концентрациях ингибиторов. [Kolyadko et al. 2015].

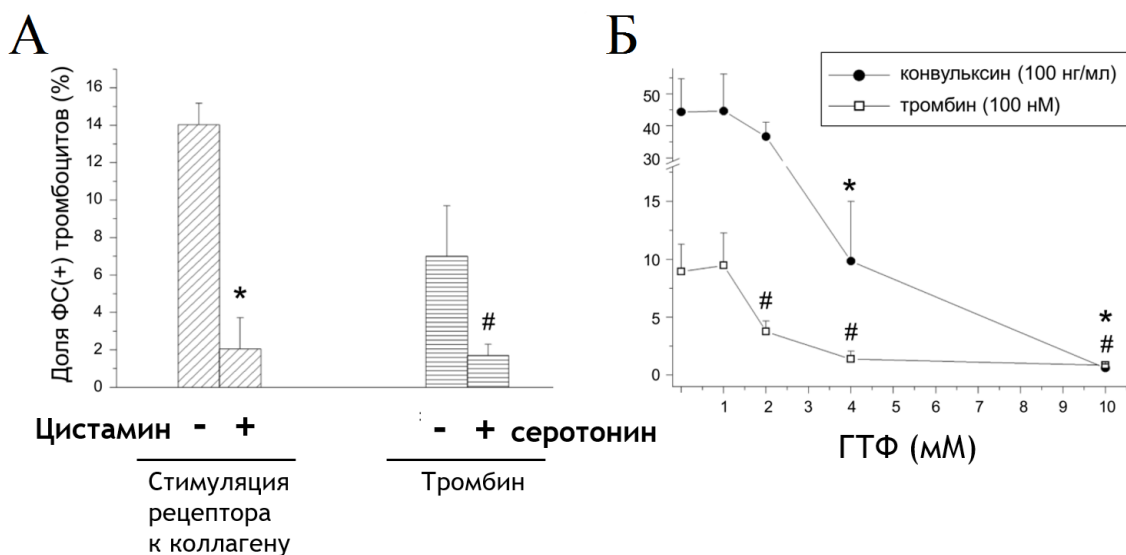


**Рисунок 6.** Мутант В не влияет на рост фибринового сгустка в плазме от ТФ (**А**) и задерживает свертывание по контактному пути в цельной крови (**Б**). **А:** Графики размера сгустка от времени в нормальной плазме, содержащей Мутант В (20 или 35 мкМ) или КТИ (15 мкМ), с добавлением нефракционированного гепарина (0,1 ед./мл) или фХIIа (20 пМ). **Б:** Время свертывания цельной крови, взятой без цитрата, при добавлении Мутанта В (10 мкМ; черные квадраты), КТИ (5 мкМ; звездочки) или контрольного раствора (30 мМ НЕРЕС; рН 7,4; пустые квадраты).

Кроме того, показано, что добавление Мутанта В или КТИ при взятии цельной крови без использования антикоагулянта позволяет увеличить время нахождения крови в жидком состоянии (до 30 мин), по сравнению с отсутствием ингибитора фХIIа (12 мин; Рисунок 6Б).

Тромбоциты с фосфатидилсеринем, которые могут активировать контактный путь, не образуются при ингибировании трансглутаминаз

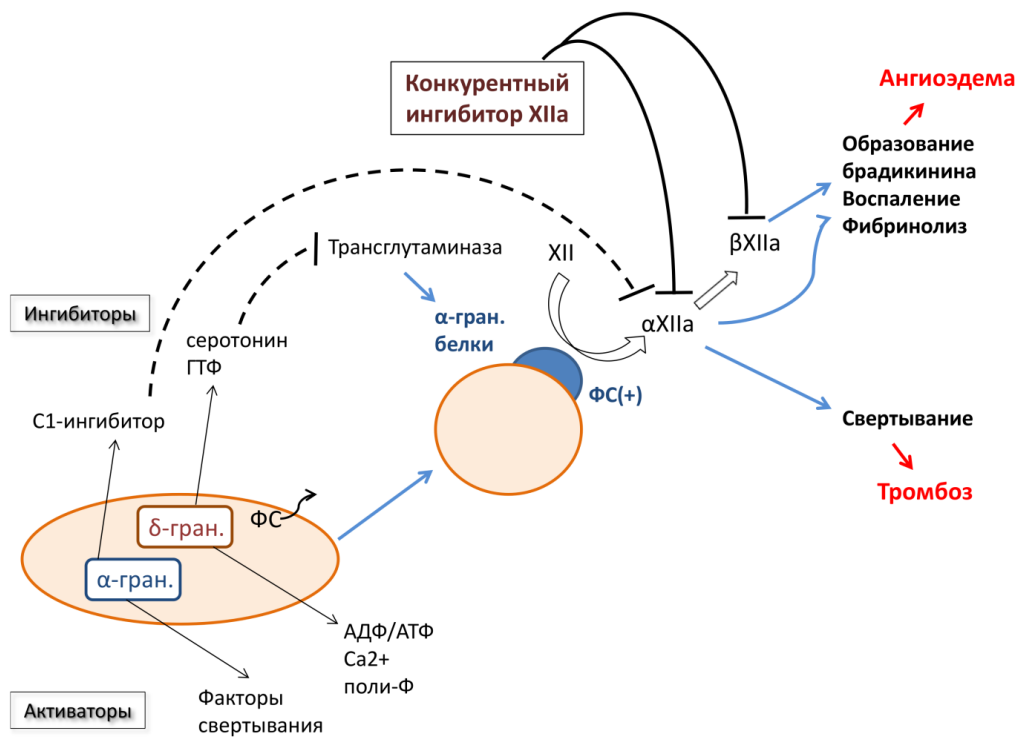
Активация фХIIа может происходить не только на чужеродной поверхности, но и на поверхности тромбоцитов с ФС на внешнем слое мембраны (ФС+ тромбоцитов) [Zakharova et al. 2015]; причем появление таких тромбоцитов при их стимуляции может регулироваться трансглутаминазной активностью, зависимой от кальция и приводящей к образованию изо-пептидных сшивок между белками [Dale et al. 2002]. Предположительно, ингибирование трансглутаминазной активности может влиять на формирование ФС+ тромбоцитов, активирующих контактный путь. Был проведен следующий эксперимент: тромбоциты, выделенные из крови здорового донора, стимулировали тромбином или активатором коллагенового рецептора в присутствии ингибиторов трансглутаминаз, после чего окрашивали метками, которые связываются с ФС или фибриногеном. Число тромбоцитов в популяциях и интенсивность флуоресценции меток на каждом тромбоците анализировали проточной цитофлуориметрией. В результате опыта показано, что конкурентный ингибитор трансглутаминаз цистамин или избыток субстрата серотонина вызывали уменьшение доли ФС+ тромбоцитов при их стимуляции коллаген-подобным пептидом и тромбином, соответственно (Рисунок 7А). Также и ГТФ, молекулы которого «переключают» активность тканевой трансглутаминазы (тТГ) на ГТФ-азную активность, дозо-зависимо уменьшал долю ФС+ тромбоцитов при их стимуляции конвульксином или тромбином (Рисунок 7Б). Полученные результаты о влиянии трансглутаминазной активности на формирование ФС+ тромбоцитов согласуются с ранее опубликованными [Dale et al. 2002].



**Рисунок 7.** Ингибирование трансглутаминазной активности при стимуляции тромбоцитов уменьшает долю тромбоцитов с фосфатидилсерином (ФС+). **А:** При добавлении цистамина (10 мМ) или серотонина (1 мМ) и при стимуляции коллаген-подобным пептидом (20 мкг/мл) или тромбином (100 нМ), формировалось меньше ФС+ тромбоцитов по сравнению с образцами без этих ингибиторов тТГ. **Б:** ГТФ, ингибирующий трансглутаминазную активность тТГ, дозо-зависимо уменьшал долю ФС+ тромбоцитов при стимуляции конвульксином (100 нг/мл; черные кружки) или тромбином (100 нМ; пустые квадраты). Показаны средние значения + SD для 3 измерений. \*, # – уровень значимости  $p < 0,05$  при сравнении с отсутствием ингибиторов (парный критерий Стьюдента). [Котова и др. 2015].

На основании полученных результатов была предложена схема, на которой отображены основные механизмы блокирования контактной активации в организме (Рисунок 8). При стимуляции тромбоцит (показан как светло-красный эллипс) секретирует альфа-гранулы ( $\alpha$ ) и плотные гранулы ( $\delta$ ), которые содержат как «активаторы» (факторы свертывания, АДФ, кальций, полифосфаты), так и «ингибиторы» (C1-ингибитор, серотонин, ГТФ). Вследствие трансглутаминазной активности на поверхности стимулированного тромбоцита (светло-красный шар) появляется ФС и структура альфа-гранулярных белков («шапка», показана синим цветом), которая, предположительно, участвует в активации фXII [Zakharova et al. 2015]. Секретированные серотонин и ГТФ могут ингибировать образование тромбоцитов с ФС; в свою очередь, полифосфаты способствуют активации фXII на тромбоцитах с ФС [Smith et al. 2006], а C1-ингибитор инактивирует

фХIIа. В результате контактной активации сначала образуется альфа-фХIIа, который связан с поверхностью, в дальнейшем из-за расщепления плазменным калликреином он превращается в растворимый бета-фХIIа. Важной физиологической ролью контактной активации является защита при проникновении в кровеносную систему чужеродных организмов. Основным эффектом активации контактного пути в организме считается наработка брадикинина и вазодилатация [Colman, Schmaier. 1997]. Повышенная активность факторов контактного пути часто приводит к патологиям, таким как тромбоз или ангиоэдема [Björkqvist et al. 2015]. Предполагается, что контактную активацию в организме можно ингибировать как прямыми ингибиторами фХIIа, так и ингибиторами трансглутаминазной активности, предотвращающими появление тромбоцитов с ФС.



**Рисунок 8.** Активаторы и ингибиторы контактной активации. При стимуляции на некоторых тромбоцитах под действием трансглутаминаз образуется «шапка» из альфа-гранулярных факторов свертывания и появляется ФС, что способствует образованию альфа-фХIIа. Тромбоциты секретируют серотонин и ГТФ, которые могут ингибировать трансглутаминаза-зависимое появление тромбоцитов с ФС, и С1-ингибитор, который, наряду с каноническими ингибиторами, может ингибировать наработанный фХIIа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показана роль аминокислотного состава и конформации протеаза-связывающей петли канонического ингибитора инфестина-4 в избирательном ингибировании фХIIа, что способствует выяснению механизмов избирательного ингибирования целевой протеазы. Автором предложены новые варианты инфестина-4 с повышенной селективностью и показано, что они специфически ингибируют контактную активацию и не влияют на свертывание по пути тканевого фактора. В перспективе, такие высокоселективные ингибиторы фХIIа могут быть использованы для повышения качества забора крови и биосовместимости имплантируемых устройств, для увеличения чувствительности диагностических тестов к патологиям гемостаза и даже для лечения и профилактики тромботических состояний. Также в работе показан трансклутаминаза-зависимый механизм формирования тромбоцитов с ФС и предположено, что контактная активация в крови может регулироваться как прямыми ингибиторами фХIIа, так и косвенным путем при помощи ингибиторов трансклутаминазной активности.

### Выводы

1. Инфестин-4 и кукурузный ингибитор трипсина ингибируют фактор ХIIа с константами 0,1 и 0,4 нМ, соответственно, и селективностью по отношению к протеазам свертывания 40 и  $40 \times 10^3$ , соответственно.
2. Внесение мутаций (в частности, замены Phe9Thr) в протеаза-связывающую петлю инфестина-4 приводит к стабилизации петли в канонической конформации и к увеличению селективности к фХIIа в  $10^2$  раз.
3. Мутант В (с заменами Phe9Thr, Tyr12Phe, Pro14Ala) является конкурентным ингибитором фХIIа ( $K_i$  0,7 нМ), который увеличивает время свертывания по контактному пути с такой же эффективной концентрацией (20 мкМ), как и дикий тип инфестина-4. Мутант В и КТИ при 5 мкМ специфически ингибируют генерацию тромбина в плазме, активированную по контактному пути.

4. Падение неспецифической активности мутантов инфестина-4 к факторам Ха и VIIa более, чем в 10 раз, и к плазмину более, чем в  $10^3$  раз, может быть вызвано «непродуктивными» связями между протеаза-связывающей петлей и каталитическими остатками нецелевых протеаз. Избирательность связывания с фXIIa может быть также обусловлена отрицательным зарядом автолитической петли протеазы.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

##### Статьи в рецензируемых научных журналах:

1. Abaeva, A.A. Procoagulant platelets form an alpha-granule protein-covered “cap” on a surface that promotes attachment to aggregates / A.A.Abaeva, M.Canault, Y.N.Kotova, S.I.Obydenyuy, A.O.Yakimenko, N.A.Podoplelova, V.N.Kolyadko, H.Chambost, A.V.Mazurov, F.I.Ataullakhanov, A.T.Nurden, M.-C.Alessi, M.A.Panteleev // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288. – pp. 29621–29632
2. Колядко, В.Н. Молекулярные механизмы тромбоза. Фундаментальные и прикладные аспекты контактной активации / В.Н.Колядко, В.А.Корнеева, Ф.И.Атауллаханов, М.А.Пантелеев // *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии*. – 2014. – Т. 31, Вып. 4. – С. 231–243
3. Korneeva, V.A. Interactions outside the proteinase-binding loop contribute significantly to the inhibition of activated coagulation factor XII by its canonical inhibitor from corn / V.A.Korneeva, M.M.Trubetskov, A.V.Korshunova, S.V.Lushchekina, V.N.Kolyadko, O.V.Sergienko, V.G.Lunin, M.A.Panteleev, F.I.Ataullakhanov // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289. – pp. 14109–14120
4. Котова, Я.Н. Роль трансглутаминаз в регулировании формирования фосфатидилсерин-положительной субпопуляции тромбоцитов при их активации / Я.Н.Котова, А.А.Абаева, В.Н.Колядко, А.О.Якименко, Ф.И.Атауллаханов, М.А.Пантелеев // *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии*. – 2015. – Т. 32, Вып. 4. – С. 245–252



5. Kolyadko, V.N. New infestin-4 mutants with increased selectivity against factor XIIa / V.N.Kolyadko, S.V.Lushchekina, T.A.Vuimo, S.S.Surov, R.A.Ovsepyan, V.A.Korneeva, I.I.Vorobiev, N.A.Orlova, L.Minakhin, K.Kuznedelov, K.V.Severinov, F.I.Ataullakhanov, M.A.Panteleev // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10, N 12. – P. e0144940

#### **Патенты:**

1. Слитый белок тиоредоксина и домена 4 инфестина, способ его получения, экспрессионная плазмидная ДНК, кодирующая слитый белок, и бактерия рода *Escherichia coli*, трансформированная такой плазмидной ДНК: пат. 2528251 Рос. Федерация: МПК С 07 К 19/00, 14/245, 14/435, С 12 N 15/09, 15/62, 1/21, С 12 Р 1/04, 21/00, С 12 R 1/185 / Воробьев И.И., Орлова Н.А., Колядко В.Н.; заявитель и патентообладатель ООО «ГемаКор». – N 2012152609/10; заявл. 07.12.12; опубл. 20.06.14, Бюл. N 17
2. Высокоселективный ингибитор контактной активации на основе инфестина 4: пат. 2556116 Рос. Федерация: МПК С 07 К 14/435, 14/81, G 01 N 33/86, С 12 Q 1/56 / Колядко В.Н., Вуймо Т.А., Овсепян Р.А. [и др.]; заявитель и патентообладатель ООО «ГемаКор». – N 2013152864/10; заявл. 28.11.13; опубл. 10.07.15, Бюл. N 19

#### **Тезисы:**

1. Kolyadko, V.N. Formation of a procoagulant protein coat on the surface of the phosphatidylserine-exposing platelets by transglutaminases / V.N.Kolyadko, Y.N.Kotova, F.I.Ataullakhanov, M.A.Panteleev // Abstracts, XXIII<sup>th</sup> Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (July 23–28, 2011, Kyoto, Japan). – Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2011. – Vol. 9, S. 2. – P. 520
2. Колядко, В.Н. Новый высокоселективный ингибитор фактора свертывания XIIa на основе инфестина-4 / В.Н.Колядко, Т.А.Вуймо, С.С.Суров, Р.А.Овсепян, В.А.Корнеева, И.И.Воробьев, Н.А.Орлова, К.Кузнецов,

- К.Северинов, Ф.И.Атауллаханов, М.А.Пантелеев // Тезисы докладов II Конгресса гематологов России (17–19 апреля 2014 г., Москва). – Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59, Вып. 1 (приложение 1). – С. 47–48
3. Kolyadko, V.N. A new highly selective factor XIIa inhibitor based on infestin-4 / V.N.Kolyadko, T.A.Vuimo, S.S.Surov, R.A.Ovsepyan, V.A.Korneeva, L.Minakhin, K.Kuznedelov, K.Severinov, I.I.Vorobiev, N.A.Orlova, F.I.Ataullakhanov, M.A.Panteleev // Abstracts, XXVII<sup>th</sup> International Symposium on Technological Innovations in Laboratory Hematology (May 15–17, 2014, the Hague, Netherlands). – International Journal of Laboratory Hematology. – 2014. – Vol. 36, S. 1. – P. 9
4. Kolyadko, V.N. Characterization and development of factor XIIa inhibitors for assaying tissue factor-triggered coagulation / V.N.Kolyadko, T.A.Vuimo, S.S.Surov, R.A.Ovsepyan, V.A.Korneeva, S.V.Lushchekina, I.I.Vorobiev, N.A.Orlova, L.Minakhin, K.Kuznedelov, K.Severinov, F.I.Ataullakhanov, M.A.Panteleev // Abstracts, 60<sup>th</sup> Annual Meeting of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (June 22–26, 2014, Milwaukee, USA). – Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2014. – Vol. 12. – P. 45.