

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ЦЕНТР ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИИ РАН

На правах рукописи

КОЛЯДКО Владимир Николаевич

**Механизмы избирательного ингибирования контактного
пути свертывания крови каноническими ингибиторами**

Специальность 03.01.02 – биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Москва 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
Глава 1. Обзор литературы	9
1.1. Система свертывания крови	9
1.1.1. Тромбоциты и плазменный гемостаз	9
1.1.2. Генерация тромбина	11
1.1.3. Пространственный рост сгустка фибрина	12
1.1.4. Система фибринолиза	13
1.2. Контактный путь свертывания	14
1.2.1. Механизм контактной активации	14
1.2.2. Физиологическая роль контактной активации	16
1.2.3. Роль контактной активации в развитии патологий	18
1.2.4. Влияние фактора XII и контактной активации на систему свертывания	19
1.2.5. Эволюция контактного пути	23
1.3. Научно-практическое значение избирательного ингибирования контактного пути	24
1.3.1. Антикоагулянтное действие ингибиторов контактного пути	24
1.3.2. Исследование динамики свертывания по внешнему пути	25
1.4. Ингибиторы фактора XIIa	27
1.4.1. Инфестин-4	28
1.4.2. Кукурузный ингибитор трипсина	31
1.4.3. Ингибитор трипсина из тыквы СМТИ-III	32
1.4.4. Создание новых ингибиторов фактора XIIa	34
1.4.5. Проблема эффективности ингибирования фактора XIIa	36
1.5. Канонический механизм ингибирования сериновых протеаз	37
1.5.1. Механизм расщепления пептидной связи в активном центре протеазы	38
1.5.2. Канонические ингибиторы	39
1.5.3. Факторы, определяющие конформацию и активность канонических ингибиторов	42

1.5.4. Неканонические механизмы ингибирования сериновых протеаз.....	45
1.6. Проблема избирательности ингибирования фактора XIIa	46
Постановка задачи	49
Глава 2. Материалы и методы.....	50
2.1. Реактивы и буферные растворы	50
2.2. Гетерологическая экспрессия ингибиторов фактора XIIa.....	52
2.2.1. Клонирование гена тыквенного ингибитора СМТИ-III и создание различных систем экспрессии	52
2.2.2. Клонирование последовательностей и экспрессия вариантов инфестина-4.....	62
2.3. Компьютерное моделирование молекулярной динамики одиночных белков и белок-белковый докинг	67
2.3.1. Молекулярная динамика ингибиторов фактора XIIa	67
2.3.2. Белок-белковый докинг ингибиторов с факторами XIIa, XIa и тромбином	68
2.4. Влияние ингибиторов фактора XIIa на систему свертывания	69
2.4.1. Определение констант ингибирования с помощью хромогенного теста.....	69
2.4.2. Оценка эффективности подавления контактной активации в плазме на основе теста активированного частичного тромбопластинового времени	71
2.4.3. Оценка влияния ингибиторов фактора XIIa на разные пути активации свертывания методом тромбодинамики.....	71
2.4.4. Постановка теста генерации тромбина.....	72
2.4.5. Исследование тромбозластографии	73
2.4.6. Забор крови в пробирку, содержащую Мутант В в качестве антикоагулянта	74
2.5. Действие ингибиторов транглутаминаз на тромбоциты с фосфатидилсерином.....	74
2.6. Статистический анализ	74
Глава 3. Результаты.....	75
3.1. Получение рекомбинантных ингибиторов фактора XIIa и изучение их свойств	75
3.1.1. Выбор наиболее эффективной системы экспрессии СМТИ-III.....	75
3.1.2. Очистка слитого белка инфестина-4 и тиоредоксина и его расщепление	80

3.1.3. Селективность ингибирования фактора XIIa каноническими ингибиторами.....	82
3.2. Внесение мутаций в протеаза-связывающую петлю инфестина-4.....	85
3.2.1. Внесенные мутации способствуют стабилизации канонической конформации.....	85
3.2.2. Мутации повысили селективность инфестина-4 к фактору XIIa.....	90
3.3. Механизмы избирательного ингибирования фактора XIIa мутантами инфестина-4.....	91
3.4. Влияние селективных ингибиторов фактора XIIa на динамику свертывания в плазме.....	95
3.4.1. Мутант инфестина-4 специфически ингибирует контактный путь свертывания в плазме, свободной от тромбоцитов.....	95
3.4.2. Возможное научно-практическое применение Мутанта В.....	99
3.5. Ингибиторы трансклутаминаз регулируют формирование фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов, активирующих контактный путь.....	102
Глава 4. Обсуждение.....	104
Заключение.....	113
Выводы.....	114
Благодарности.....	115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	119

Введение

Актуальность. Свертывание крови (гемостаз) является механизмом защиты от кровопотери при нарушении целостности сосудистой системы. Этот механизм включает прикрепление тромбоцитов к месту повреждения и образование нитей фибрина в ходе реакций плазменного звена. Эти реакции запускаются тканевым фактором в физиологических условиях и катализируются активными сериновыми протеазами-факторами свертывания. Ключевая протеаза тромбин стимулирует тромбоциты, в результате чего они могут экспонировать на мембране фосфатидилсерин и становиться «прокоагулянтными». Такие тромбоциты способны активировать свертывание по контактному пути и ускорять реакции плазменного звена. Нарушения нормального свертывания могут приводить к тромбозу – патологическому образованию сгустка в просвете сосуда и основной причине смертей в современном мире. Предположительно, тромбоз возникает вследствие повышенной контактной активации свертывания, которая может происходить при контакте плазмы крови с поверхностью прокоагулянтных тромбоцитов или чужеродных тел. В результате контакта с поверхностью на ней образуется активный фактор свертывания XIIa (фXIIa), который запускает дальнейшие реакции, активируя фактор XIa. Причем ингибирование фXIIa не нарушает свертывание при поранении организма, т.е. фXIIa не влияет на гемостаз. Поэтому фXIIa может являться мишенью для новых препаратов против тромбозов, безопасных с точки зрения риска кровотечения.

Среди полусотни известных ингибиторов фXIIa абсолютное большинство имеет низкую ингибирующую активность и малую избирательность к фXIIa относительно других протеаз свертывания. Наибольшей активностью против фXIIa может обладать инфестин-4, выделенный из желудка кровососущего насекомого *Triatoma infestans*, а также ингибиторы трипсина из семян кукурузы (КТИ), тыквы (СМТИ-III) и огурца (ЛСТИ-III). Для большинства ингибиторов константы ингибирования фXIIa составляют от 0,1 до 10 нМ и более, а их селективность либо является крайне низкой (порядка 10 – 100), либо остается малоизученной. Также плохо изучено влияние этих ингибиторов на динамику свертывания. Указанные ингибиторы фXIIa, предположительно, относятся к классу канонических, для которых характерны следующие черты: ингибитор состоит из 20 – 80 аминокислотных остатков, имеет гибкую протеаза-связывающую петлю и жесткий «остов», скрепленный несколькими дисульфидными связями. Взаимодействие петли ингибитора с каталитическим карманом протеазы может определять ингибирующую активность. Причем при образовании комплекса между каноническим ингибитором и протеазой петля принимает строго определенную, «каноническую» конформацию. Такая конформация стабилизируется нековалентными взаимодействиями между остатками петли и остова внутри ингибитора, а

внесение мутаций, усиливающих эти взаимодействия, приводит к увеличению ингибирующей активности против целевой протеазы. Однако вопрос о механизмах, обеспечивающих избирательность ингибирования целевой протеазы каноническими ингибиторами, остается малоизученным. Разрешение этого вопроса позволило бы разработать универсальную стратегию поиска и создания ингибиторов с заданной активностью и селективностью.

Целью данной работы было исследование механизмов избирательного ингибирования контактного пути свертывания каноническими ингибиторами фактора XIIa. В задаче исследования входило:

1. определить селективность ингибирования факторов XIIa, XIa и калликреина прямыми каноническими ингибиторами: инфестином-4, ингибиторами трипсина из кукурузы, огурца, 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, фXa).

Научная новизна. В работе определена селективность ингибирования фXIIa наиболее активными каноническими ингибиторами: инфестином-4 и КТИ. Путем определения остаточной активности очищенных протеаз показано, что инфестин-4 обладает неспецифической ингибирующей активностью против пламина и факторов Xa, IXa, VIIa, в то время как КТИ – против фактора XIa и активного протеина C. С помощью сайт-направленного мутагенеза произведены аминокислотные замены в протеаза-связывающей петле инфестина-4, приводящие к уменьшению неспецифической активности против пламина, фXa, фIXa, фVIIa и к увеличению селективности ингибирования фXIIa на 2 порядка величины. Молекулярнодинамическим моделированием показано, что эти мутации могут приводить к стабилизации канонической конформации петли инфестина-4.

Экспериментально показано, что мутанты инфестина-4 являются конкурентными ингибиторами фXIIa. На основании экспериментальных результатов, а также результатов белок-белкового докинга и сравнения аминокислотных последовательностей предположено, что ингибирующая активность инфестина-4 против фXIIa может определяться нековалентными взаимодействиями как с каталитическим карманом фXIIa, так и с автолитической петлей протеазы. Также предположено, что отсутствие неспецифической активности мутантов

инфестина-4 против фХа вызвано непродуктивными взаимодействиями петли ингибитора с каталитическими остатками протеазы. Экспериментально доказано, что селективные ингибиторы фХIIа в плазме крови специфически ингибируют контактный путь свертывания и не влияют на процесс свертывания по пути тканевого фактора. Кроме того, проточной цитометрией 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 фХIIа, которые могут стать основой для безопасного лечения и профилактики тромботических состояний. Предложены новые варианты ингибитора инфестина-4, специфически блокирующие контактный путь свертывания в плазме крови. Такие ингибиторы могут быть использованы при создании новых методов хранения и исследования крови, в частности, для повышения качества забора крови, для увеличения срока хранения компонентов крови и для повышения чувствительности диагностических тестов гемостаза к патологическим состояниям. Изучение условий формирования прокоагулянтных тромбоцитов вносит вклад в понимание роли фХIIа и взаимосвязи между плазменным и тромбоцитарным звеном гемостаза. Данная работа показывает, что активность фХIIа в крови может регулироваться как прямыми ингибиторами фХIIа, которые связываются с каталитическим карманом протеазы, так и при помощи ингибиторов трансглутаминазной активности, которые предотвращают появление прокоагулянтных тромбоцитов.

Методология и методы исследования. Для получения рекомбинантных ингибиторов фактора ХIIа использовались методы молекулярного клонирования; константы ингибирования против очищенных протеаз измеряли с использованием хромогенных субстратов. Для оценки влияния ингибиторов на динамику свертывания использовались современные биофизические и биохимические методы: исследование кинетики генерации тромбина, тромбоэластографии и тромбодинамики. Структурные особенности ингибиторов и их комплексов с протеазой исследовали с использованием современных и адекватных методов молекулярной динамики и белок-белкового докинга. Вклад трансглутаминаз в формирование прокоагулянтной поверхности тромбоцитов исследовали с помощью современного метода проточной цитометрии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Инфестин-4 является наиболее активным ингибитором фХIIа 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 фХIIa.
3. Мутант В инфестина-4, конкурентно ингибирующий фХIIa (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 фХIIa 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 планировании и выполнении экспериментальной работы по получению ингибиторов и созданию новых мутантов, измерению констант ингибирования, исследованию процессов свертывания и формирования прокоагулянтных тромбоцитов, а также в анализе полученных результатов и литературных данных, в подготовке к публикации научных статей, патентных заявок и тезисов конференций, в 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. Материалы диссертации представлены автором на следующих конференциях и конгрессах: 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), 60th Annual Meeting of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH (22 – 26 июня 2014, Милуоки, США).

Публикации. По материалам диссертации получено 2 патента, опубликованы 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.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Система свертывания крови

1.1.1. Тромбоциты и плазменный гемостаз

Система свертывания крови защищает организм от кровопотери при нарушении целостности стенки сосудов. Первым ответом системы гемостаза, который начинает происходить в первые секунды после повреждения, является образование агрегата тромбоцитов, перекрывающего место повреждения. Через время порядка 10 – 100 секунд образуется сгусток фибрина, скрепляющий тромбоциты в агрегате и прикрепляющий его к месту повреждения (Рисунок 1). Также ответом системы гемостаза является сужение просвета поврежденного сосуда для уменьшения кровопотери [1].

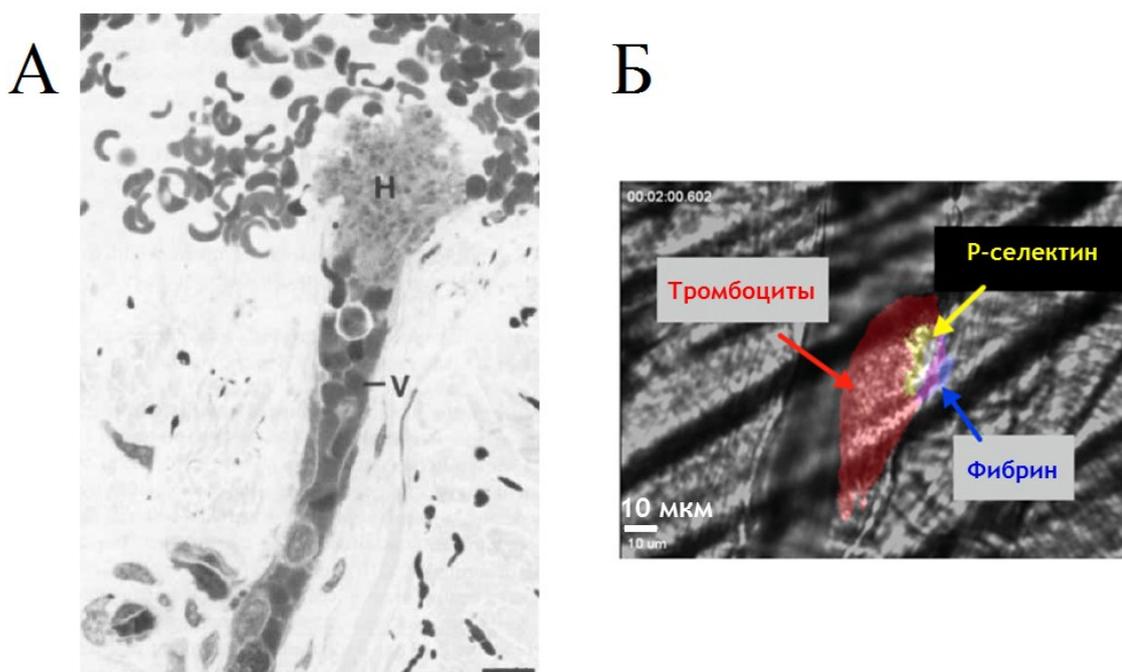


Рисунок 1. При гемостазе (А) и тромбозе (Б) место повреждения в сосуде перекрывается тромбоцитами, которые прикрепляются фибрином к месту повреждения. (А): Фотография подкожного сосуда (V) у пациента с гемофилией А и гемостатического сгустка (Н), полученная световой микроскопией через 3 минуты после повреждения. Сверху фотографии видны эритроциты, заполнившие рану; в середине – тромбоциты, которые составляют основу сгустка и обрамлены по краям фибрином. Масштабный отрезок – 10 мкм [2]. (Б): Прижизненная конфокальная микроскопия лазер-индуцированного тромба в артериоле брыжейки у мыши, которой ввели в кровоток флуоресцентно меченые антитела к тромбоцитам (красные), активированным тромбоцитам (маркер – Р-селектин; желтые), фибрину (синий). Адаптировано из работы [3].

Повреждение сосуда приводит к контакту элементов крови (тромбоцитов, плазмы крови, а также эритроцитов и лейкоцитов) с внесосудистыми тканями, в частности, с соединительной тканью: коллагеном, фибробластами и т.д. Фибриллярный белок коллаген, который оголяется в ране, служит сигналом для тромбоцитов, которые прикрепляются к нему и активируются посредством рецептора, гликопротеина VI. В результате в тромбоците запускаются сигнальные каскады, которые приводят к перестройке цитоскелета, активации рецепторов, в частности, рецептора к фибрину/фибриногену, интегрина альфа2b-бета3, и к секреции гранул тромбоцита – альфа-гранул (содержащих Р-селектин, фактор свертывания V, С1-ингибитор и другие белковые компоненты свертывания), а также плотных гранул (содержащих низкомолекулярные соединения, действующие на тромбоциты: АДФ, серотонин, ГТФ и другие). Секретированные соединения, такие как АДФ, усиливают активацию ранее неактивных тромбоцитов, что приводит к их прочному скреплению друг с другом через интегрин альфа2b-бета3 и молекулы фибрина или фибриногена [4, 5].

Трансмембранный белок тканевый фактор (ТФ), который экспонирован на поверхности фибробластов (а также всех других клеток, кроме клеток крови и эндотелия сосудов), служит сигналом для запуска каскада реакций плазменного свертывания (Рисунок 2). Эти реакции – реакции точечной протеолитической активации неактивных белков-предшественников факторов свертывания, растворенных в плазме. Большинство активных факторов системы свертывания, таких как факторы VIIa, IXa, Xa, тромбин, XIa, XIIa, активный протеин С, представляют собой сериновые протеазы, состоящие из каталитического домена и нескольких регуляторных доменов, опосредующих их связывание с поверхностями, другими факторами свертывания, ингибиторами и т.д. Некоторые факторы свертывания представляют собой кофакторы активных протеаз – это факторы VIIIa и Va. При запуске свертывания фVII и следовые количества фVIIa связываются с ТФ и активируют факторы IX и X. Фактор Xa в свою очередь активирует тромбин из протромбина. Через несколько секунд после запуска свертывания образуются следовые количества тромбина ($\ll 1$ нМ), которые активируют факторы VIIa, Va и VIIIa. Эти реакции представляют собой положительные обратные связи в системе; так, фактор Va, связываясь с Xa и протромбином на отрицательно заряженной мембране микрочастиц и активированных тромбоцитов, образует комплекс протромбиназы и ускоряет реакцию образования тромбина в 10^5 раз [6, 7].

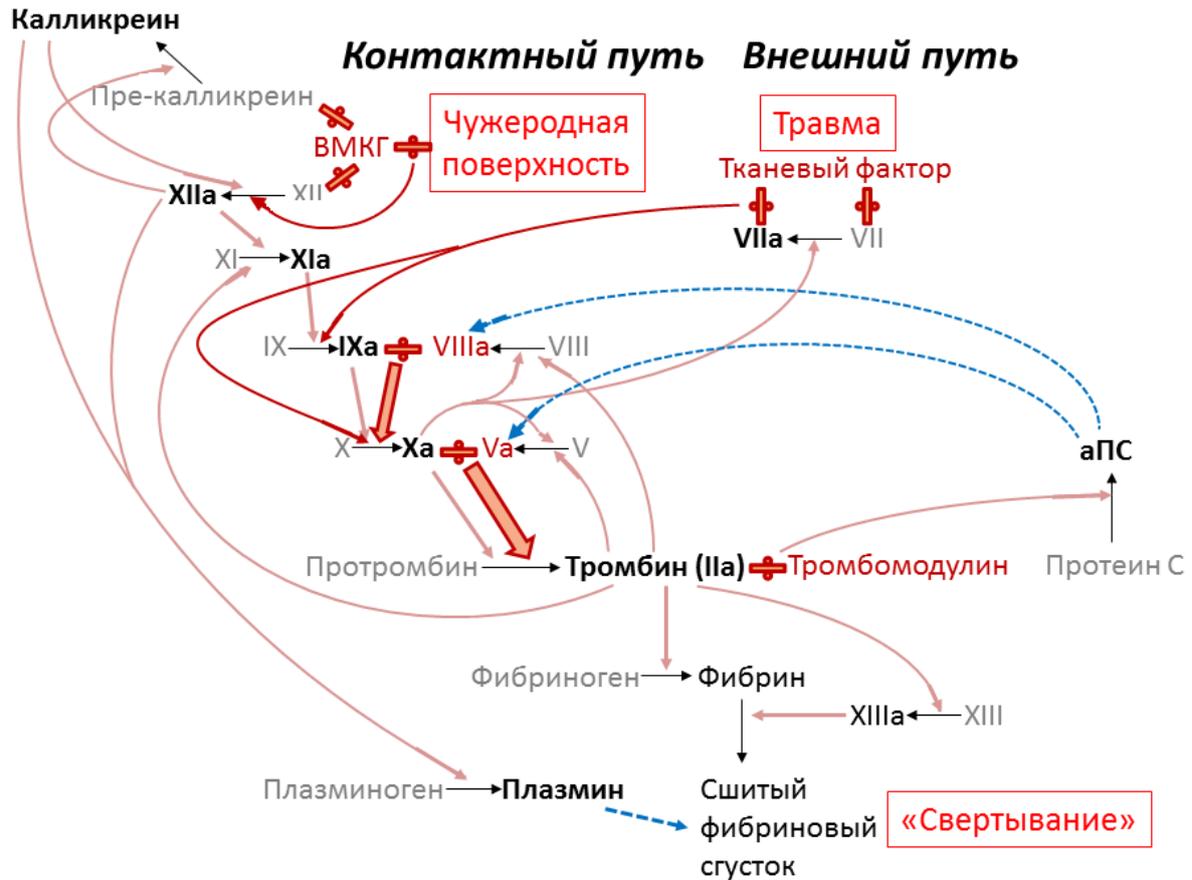


Рисунок 2. Схема реакций плазменного звена свертывания. При травме фактор VII/VIIa из плазмы крови связывается с тканевым фактором на мембранах клеток соединительной ткани, что приводит к активации факторов свертывания по внешнему пути и образованию фактора Xa и тромбина. Тромбин и Xa активируют кофакторы V и VIII, а при связывании тромбина с тромбомодулином – протеин С, который протеолитически деградирует Va и VIIIa. Тромбин приводит к образованию фибрина, а также активирует фXIIIa, который сшивает полимеры фибрина. Также тромбин активирует XI, что приводит к наработке фIXa вдали от места повреждения и способствует увеличению пространственных размеров фибринового сгустка. Активация XI может также проходить по контактному пути под действием XIIa, который образуется при связывании с чужеродной поверхностью высокомолекулярного кининогена (ВМКГ), XII и пре-калликреина и при взаимной активации калликреина и XIIa. Нароботанные факторы контактного пути также могут активировать плазминоген, связанный с фибриногеном и фибрином, в результате чего плазмин протеолитически расщепляет фибриновый сгусток. Знаком «⇌» показано образование комплекса с кофактором; черными стрелками – реакции превращения активных факторов свертывания из неактивных белков-предшественников; красными стрелками – реакции катализа, в частности, реакции протеолитической активации факторов; синими стрелками – реакции протеолитической деградации.

1.1.2. Генерация тромбина

В результате положительной обратной связи, с задержкой по времени порядка 10 – 100 секунд, происходит взрывообразное образование тромбина (до концентраций порядка 100 нМ).

Такие высокие концентрации тромбина, которые образуются в непосредственной близости с местом повреждения, активируют тромбоциты, прикрепленные к коллагену или другим тромбоцитам, через рецепторы PAR1 и PAR4. В результате активации сигнальных путей внутри тромбоцита происходит секреция гранул и другие события, включая появление отрицательно заряженного фосфолипида, фосфатидилсерина (ФС), на внешнем слое мембраны тромбоцита [8]. Последнее событие происходит с задержкой по времени порядка нескольких минут и может оказывать важное действие на плазменное звено. На отрицательно заряженной мембране тромбоцитов с ФС, также называемых прокоагулянтными, могут собираться мембранные комплексы протромбиназы и внутренней теназы, состоящей из факторов IXa, VIIIa и X [9], тем самым ускоряя наработку тромбина. Появление тромбоцитов с ФС и, возможно, дополнительное закрепление на них факторов свертывания может быть связано с активностью трансглутаминаз – ферментов, катализирующих образование изо-пептидных связей между белковыми молекулами. Трансглутаминазы тромбоцитов – тканевая трансглутаминаза и активируемый тромбином фактор XIIIa, могут ковалентно сшивать белки через молекулы серотонина, секретлируемые тромбоцитами [10].

1.1.3. Пространственный рост сгустка фибрина

Наработанный тромбин превращает фибриноген, растворимый белок плазмы, в фибрин, который образует длинные (порядка 0,1 – 1 мкм) полимеры, ковалентно сшиваемые друг с другом фактором XIIIa. Образование фибринового сгустка вначале происходит вблизи места повреждения сосуда, которое покрыто агрегатом тромбоцитов. Тромбоциты могут служить роль защитной оболочки, которая уменьшает конвективный перенос вещества внутри тромба (на 3 – 4 порядка по сравнению с просветом сосуда) и способствует диффузии внутри тромба различных соединений: агонистов тромбоцитов, активных факторов свертывания и др. [11].

Как предполагается, диффузионное распространение фактора IXa может приводить к автоволновому распространению тромбина в пространстве и линейному росту размера фибринового сгустка со скоростью порядка 1 мкм/сек. Диффузия тромбина и IXa не может обеспечить линейный рост сгустка фибрина из-за относительно быстрой необратимой инактивации плазменными ингибиторами: антитромбином, альфа2-макрोगлобулином и другими [12]. Эти ингибиторы регулируют активность протеаз свертывания (так, их дефицит приводит к повышению риска тромбоза) и отвечают за уменьшение концентрации тромбина до нуля за характерное время порядка 100 с. Скорость инактивации этими ингибиторами фактора IXa на порядок ниже, чем фактора IXa и тромбина, что позволяет фактору IXa эффективно

диффундировать, обеспечивая полимеризацию фибрина на расстояниях порядка $10^2 - 10^3$ мкм от первоначального места активации свертывания [13]. Возможно, пространственное распространение фибрина необходимо, чтобы прочно «склеить» тромбоцитарный агрегат, а также чтобы «заякорить» сгусток в поврежденной соединительной ткани.

Рост размеров фибринового сгустка может остановиться на поверхности неповрежденного эндотелия сосуда, на которой присутствует тромбомодулин. Тромбомодулин является кофактором тромбина, который способствует активации протеина С. Активный протеин С (аПС) является протеазой, которая деградирует факторы Va и VIIIa в реакциях петли отрицательной обратной связи [14]. Важность этого регуляторного механизма иллюстрируется тем, что у пациентов с мутацией фV Лейден, при которой в полипептиде фV изменен сайт расщепления протеином С и не происходит инактивация фVa, повышен риск тромбозов. В целом, исходя из описанного выше, можно заключить, что система свертывания является сложно регулируемой системой [15]. При нарушениях в регуляции этой системы могут возникать как массивные кровотечения, так и тромбоз. Тромбоз – это патологическое внутрисосудистое образование сгустка (тромба), являющееся ведущей причиной смертности и инвалидности в современном мире. Тромб может вызывать окклюзию (перекрытие просвета сосуда) в месте своего образования или может вызывать тромбоэмболию в области, локализованной ниже по направлению тока крови. Окклюзия сосуда приводит к понижению доставки кислорода в ткани (т.е. к гипоксии и аноксии), вызывая инфаркт и некроз тканей. Наиболее опасными проявлениями тромбоза являются тромбоэмболия легочной артерии (смертность более 10 %) [16], геморрагический инсульт (смертность в течение первого года 60 – 70 %) [17] и инфаркт миокарда (смертность 5 – 10 %) [18]. Несмотря на высокую опасность патологического тромбообразования, до сих пор не существует одновременно эффективного и безопасного метода профилактики и лечения тромбозов.

1.1.4. Система фибринолиза

С системой свертывания тесно связана система фибринолиза. Ее ключевой фермент – плазмин, который также является сериновой протеазой и образуется из плазминогена (концентрация в плазме 2 мкМ) в результате точечного протеолиза. Плазминоген активируется при точечном протеолизе тканевым (тПА) и урокиназным (уПА) активаторами плазминогена; тПА секретируется в кровоток эндотелием сосудов при развитии воспаления, стазисе крови и других патологических состояниях. Также плазмин активируется ферментами контактного пути свертывания (см. ниже). Активность протеаз фибринолиза регулируется ингибиторами,

относящимися к классу серпинов: альфа₂-антиплазмином, альфа₁-антитрипсином и ингибитором активатора плазминогена-1 (PAI-1) [19]. При связывании с фибриновым сгустком плазмин защищен от действия ингибиторов и способен разрезать ковалентно сшитые полимеры фибрина, таким образом деградируя фибриновый сгусток [20]. В результате действия плазмينا сгусток расщепляется на так называемые D-димеры фибрина (они состоят из D доменов двух молекул фибрина, связанных друг с другом). Детекция уровня D-димеров в плазме пациента с помощью иммуноферментного анализа является основой широко распространенного теста для оценки протромботического состояния пациента. Активность плазмينا косвенно регулируется ингибитором фибринолиза, активируемым тромбином (TAFI). TAFI является протеазой, которая активируется тромбином и которая отщепляет от молекулы фибрина участки, служащие сайтами связывания плазмينا; в результате действия этой протеазы плазмин не связывается с фибриновым сгустком, а инактивируется ингибиторами класса серпинов.

1.2. Контактный путь свертывания

1.2.1. Механизм контактной активации

В то время, как при повреждении сосуда система свертывания активируется по пути ТФ, в некоторых случаях, рассмотренных ниже, свертывание активируется также и по контактному пути. Контактная активация представляет собой автоактивацию фXII при контакте плазмы крови с отрицательно заряженными поверхностями. Такими поверхностями могут служить стенки чужеродных предметов, контактирующих с кровью (игл, катетеров, пробирок, а также бактериальная клеточная стенка), или эндогенные поли-анионные соединения, такие как ДНК и РНК, полифосфаты из тромбоцитов, гепарин из тучных клеток, агрегаты амилоидных белков, а также поверхность прокоагулянтных тромбоцитов с ФС [21]. Способность активировать контактный путь зависит от плотности отрицательных зарядов на поверхности. Например, полимеры декстран сульфата и хондроитин сульфата, в которых на один дисахарид приходится 4 остатка сульфата, при добавлении в плазму являются сильными активаторами контактного пути; гепарин, в котором 3 отрицательно заряженных остатка приходится на один дисахарид, является более слабым активатором, а гепаран сульфат (1 отрицательный заряд на дисахарид) вовсе является инертным по отношению к контактному пути [22].

В кровотоке присутствует 0,3 мкМ фактора XII в неактивном состоянии, который представляет собой одноцепочечный полипептид массой 80 кДа. При контакте плазмы с поверхностью на нее сначала сорбируются белки, наиболее распространенные в плазме

(альбумин, фибриноген и другие), после чего они замещаются комплексом фХII с высокомолекулярным кининогеном (ВМКГ; 120 кДа; 0,67 мкМ в плазме), фХI (160 кДа; 0,03 мкМ) и плазменным пре-калликреином (87 кДа; 0,5 мкМ), и адгезионные свойства поверхности ухудшаются. Молекула ВМКГ содержит на С-конце сайты связывания фХI и пре-калликреина; также ВМКГ имеет богатый гистидином домен, который заряжен положительно и вместе с ионами цинка опосредует связывание комплекса белков контактного пути с анионными поверхностями. Кроме того, сайты связывания ВМКГ (которые, в основном, представляют собой протеогликаны) находятся на мембранах тромбоцитов, гранулоцитов и эндотелиальных клеток (плотность сайтов связывания составляет порядка 10^3 , 10^5 и 10^7 на одну клетку, соответственно) [22]. Прямое связывание фХII с поверхностями осуществляется также цинк-зависимым образом доменами на N-конце фактора, который включает фибронектиновые домены I и II типов, два домена, подобных эпидермальному фактору роста (EGF), Крингл-домен и богатый пролином домен. В фибронектиновом домене II типа фХII находится сайт связывания фХI [23].

Молекулярный механизм автоактивации фХII еще не изучен подробно, но предполагается, что при связывании с поверхностью конформация каталитического домена фХII изменяется таким образом, что в результате он приобретает способность протеолитически активировать небольшие количества плазменного калликреина и собственно фактора XIIa. Калликреин, в свою очередь, активирует фХIIa путем разрезания его цепи после Arg353 (Рисунок 3), в результате чего образуется альфа-фХIIa (80 кДа), состоящий из двух цепей, соединенных дисульфидным мостиком. Так как альфа-фХIIa сохраняет N-концевые домены, то он остается связанным с поверхностью, может связывать и активировать фХI, а значит, и активировать свертывание по контактному пути. Также альфа-фХIIa активирует плазменный калликреин, который в свою очередь катализирует образование альфа-фХIIa [23]. Указанные реакции составляют петлю положительной обратной связи; взаимная активация фХIIa и калликреина приводит к ускоренной наработке двух протеаз в первые моменты времени после контакта плазмы с поверхностью [24]. Кроме разрезания сайта Arg353 в молекуле фХII, калликреин также расщепляет пептидную связь после Arg334, что приводит к отпаданию N-концевой тяжелой цепи, содержащей регуляторные домены, и образованию бета-фХIIa (28 кДа), который состоит из каталитического домена легкой цепи, связанного дисульфидным мостиком с коротким остаточным пептидом (после дополнительного расщепления сайта Arg343 этот пептид состоит всего из 9 остатков). Предполагается, что этот нонапептид служит для созревания или стабилизации активной конформации каталитического домена, потому что рекомбинантный вариант каталитического домена фХIIa, не имеющий этого пептида, не обладает протеолитической активностью [25]. Бета-

фХIIа теряет способность связываться с поверхностью и активировать свертывание, он переходит в раствор, но сохраняет способность активировать калликреин и плазмин.

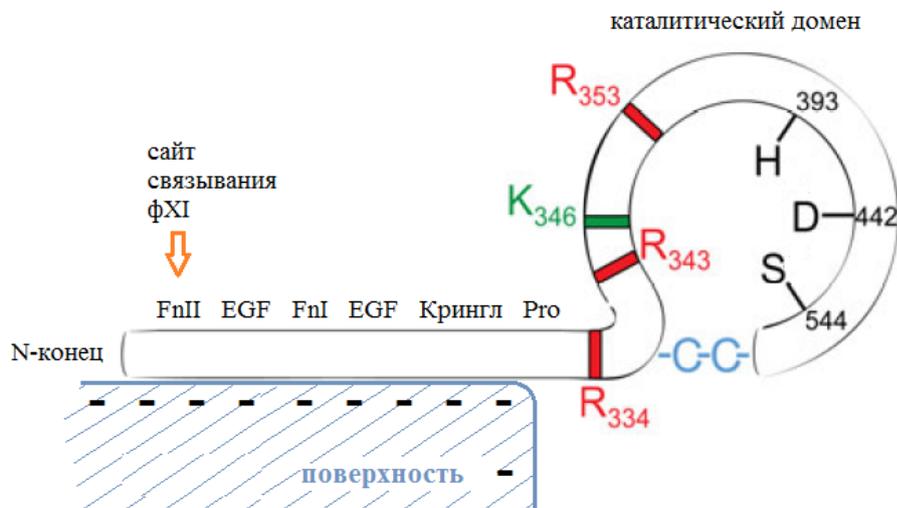


Рисунок 3. Схематическое строение молекулы фХII. N-концевой участок молекулы содержит домены, отвечающие за связывание с поверхностью, фХI, пре-калликреином и ВМКГ; обозначения доменов: FnII и FnI – фибронектиновые домены типа II и I, соответственно, EGF – эпидермальный фактор роста-подобный домен, Крингл – Крингл-домен, Pro – богатая пролином область. Красным обозначены сайты для расщепления калликреином: R334, R343, R353 (однобуквенное обозначение аминокислотных остатков); зеленым – сайт расщепления плазмином: K346. Показана каталитическая триада S544, H393, D442 С-концевого каталитического домена (нумерация аминокислот по зрелому полипептиду фХII). Адаптировано из [23].

Активность протеаз контактного пути регулируется плазменными ингибиторами класса серпинов: С1-ингибитором, а также антитромбином и PAI-1 [26]. С1-ингибитор и антитромбин относятся к семейству I04.001 альфа1-ингибиторов протеаз [27]. Комплекс между фХIIа и С1-ингибитором образуется в плазме в первую очередь при активации контактного пути чужеродной поверхностью стекла или суспензией каолина, в то время как при активации фХIIа стимулированными тромбоцитами образуется, преимущественно, комплекс фХIIа с антитромбином, причем ингибирующая активность последнего усиливается гепарином [28, 29].

1.2.2. Физиологическая роль контактной активации

В результате контактной активации образуется калликреин, важный фермент калликреин-кининовой системы. Примечательно, что на мембранах эндотелиальных клеток контактная активация калликреина может происходить без активации фХII. Как фХIIа, так и калликреин отщепляют от ВМКГ короткие пептиды, в том числе и брадикинин [30]. Брадикинин состоит из 9 аминокислотных остатков (а.о.), RPPGFSPFR, и является медиатором вазодилатации

(расширения просвета сосудов и снижения давления) и повышения проницаемости сосудов (Рисунок 4). Связываясь с V1 и V2 рецепторами, брадикинин стимулирует в клетках неповрежденного эндотелия синтез простаглицлина, являющегося ингибитором функции тромбоцитов, а также стимулирует выработку оксида азота и цГМФ, предотвращая пролиферацию гладкомышечных клеток субэндотелия. В то же время, если эндотелий поврежден, брадикинин стимулирует протеин киназу C и митоген-активируемую протеин киназу, вызывая рост и пролиферацию гладкомышечных клеток и способствуя восстановлению целостности сосуда. Брадикинин и другие фрагменты ВМКГ связываются с тромбоцитами и ингибируют их стимуляцию тромбином. Деградация брадикинина осуществляется ангиотензин-превращающим ферментом, ингибиторы которого способны поддерживать высокий уровень брадикинина и оксида азота в сосуде, уменьшая внутрисосудистое давление и защищая сердечную ткань от ишемии в экспериментальной модели перфузии изолированного сердца [22].

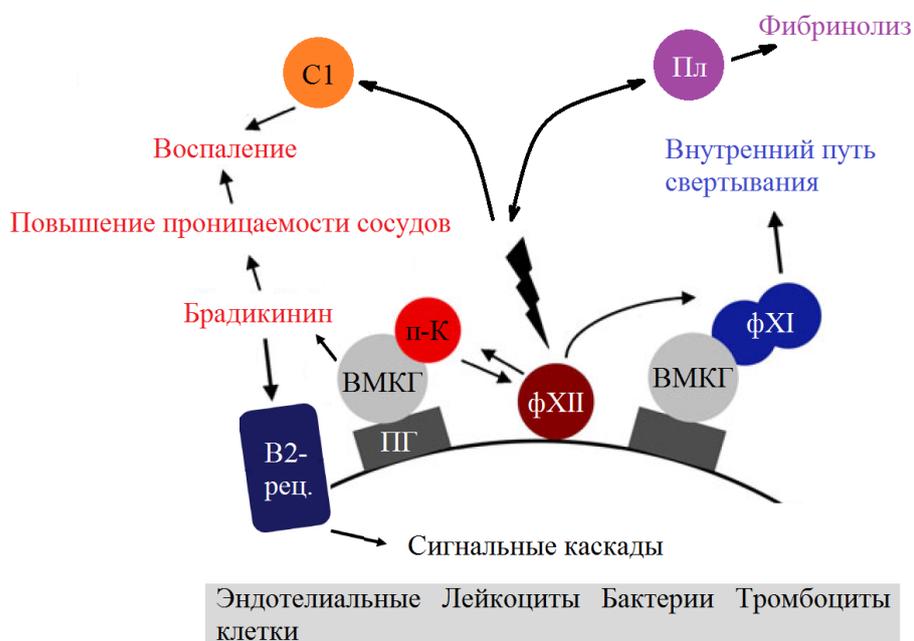


Рисунок 4. Связь контактной активации с системами фибринолиза, комплемента и калликреин-кининовой системой. Контактная активация происходит при сборке белкового комплекса высокомолекулярного кининогена (ВМКГ), фХII, фХI и плазменного пре-калликреина (п-К) на поверхности эндотелия, иммунных клеток или тромбоцитов, содержащих поли-анионные соединения (полифосфаты и гепарины), а также на поверхности бактерий, содержащих полисахариды клеточной стенки. ВМКГ связывается с эндотелием через протеогликаны (ПГ) на его поверхности. Образовавшийся в результате контактной активации фХII запускает внутренний путь свертывания и образование фибрина, а калликреин – выработку брадикинина, который запускает сигнальные пути в эндотелиальной клетке через V2 рецептор (V2-реп.), увеличивая проницаемость сосудов и вызывая вазодилатацию. Факторы контактного пути также активируют C1-эстеразу (C1) и плазмин (Пл), запуская системы комплемента и фибринолиза, соответственно. Адаптировано из [31].

Стимуляция роста эндотелия и ангиогенеза (процесса развития новых кровеносных сосудов) также происходит, когда фХII и альфа-фХIIа цинк-зависимым образом через EGF-домены связываются с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) на мембране эндотелиальных клеток. Причем такое связывание защищает альфа-фХIIа от инактивации С1-ингибитором [32, 33]. Активация системы фибринолиза происходит при активации калликреином и фХIIа урокиназного активатора плазминогена и самого плазмина. Более того, нарабатанный в результате контактной активации брадикинин способен стимулировать высвобождение тПА из клеток эндотелия. Также активные факторы контактного пути активируют иммунную систему: фХIIа активирует С1 эстеразу, запуская классический путь системы комплемента, и, связываясь с калликреином и ВМКГ на мембране нейтрофилов, вызывает хемотаксис, агрегацию и дегрануляцию (секрецию эластазы) нейтрофилов. Контактная активация стимулирует в нейтрофилах гликолиз и синтез супероксида, а в моноцитах – производство интерлейкинов-1 и -6 [22].

1.2.3. Роль контактной активации в развитии патологий

Контактная активация играет защитную роль при инородной инвазии в кровоток хозяина, однако при повышенном уровне активаторов контактного пути реагирование этой системы приводит к развитию тяжелых, в т.ч. смертельных, патологий. Так, активные факторы контактного пути служат медиаторами синдрома системного воспалительного ответа, который развивается в том числе при тифоидной лихорадке, остром респираторном дистресс-синдроме и пятнистой лихорадке Скалистых гор. При сепсисе обширная контактная активация на липополисахаридах, составляющих клеточную стенку бактерий, и последующая наработка брадикинина приводят к летальной гипотонии. В экспериментальной модели септического шока ингибирование факторов контактного пути предотвращает развитие гипотонии и повышает выживаемость животных. В экспериментальной модели воспалительного артрита на крысах, вызванного внутрибрюшинным введением молекул протеогликана-полисахарида из стрептококков группы А, было показано, что ингибирование калликреина приводило к исчезновению таких проявлений артропатии, как увеличение объема суставов и объема селезенки. В аналогичной модели энтероколита, в которой воспаление кишечника приводило к увеличению лимфатических узлов, геморрагиям, эдеме, утончению стенки кишечника, а также к развитию артрита, применение ингибитора калликреина подавляло эти проявления энтероколита [22].

Наследственное повышение активности факторов контактного пути может проявиться в ангиоэдеме (ангионевротическом отеке). В большинстве случаев, это заболевание вызвано дефицитом С1-ингибитора, что приводит к повышенной выработке брадикинина и появлению обширных отеков на теле. Для лечения в таких случаях применяется очищенный С1-ингибитор, ингибитор калликреина или антагонист рецептора брадикинина. Недавно был описан случай наследственной ангиоэдемы III типа, вызванной мутацией фХII и нарушенным гликозилированием фХII в позиции Thr309 и проявившейся в повышенной (авто)активации мутантного фХII; причем скорость инактивации С1-ингибитором для данного мутанта фХIIа не отличалась от дикого типа [34].

Контактная активация происходит также при обширном контакте крови с искусственными поверхностями, например, при использовании аппарата искусственного кровообращения (АИК) для проведения сердечно-легочного шунтирования или при экстракорпоральной мембранной оксигенации, которые применяются при операциях на сердце, легких и других крупных органах. Площадь контакта крови с компонентами АИК составляет порядка 4 м²; при циркуляции крови в АИК активируются системы фибринолиза и комплемента, что может приводить к увеличению послеоперационной кровопотери и развитию системного воспаления. Более того, контактная активация свертывания может приводить к образованию сгустков и закупорке трубок АИК, что приводит к увеличению риска тромбозов и угрожает жизни пациента [35]. Последствия применения АИК предотвращаются применением ингибиторов калликреина и плазмина (например, апротинина). Для этого также трубочки и другие поверхности АИК покрываются ингибиторами фХа и тромбина, такими как гепарин, бензамидин и т.д. [36, 37]. Недостаток такого способа блокирования свертывания в АИК заключается в том, что добавление ингибиторов фХа и тромбина не препятствует выработке фХIIа, который может инициировать свертывание после вливания крови или плазмы в сосудистое русло организма [38].

1.2.4. Влияние фактора XII и контактной активации на систему свертывания

Контактная активация влияет на несколько факторов системы свертывания. Как упоминалось выше, альфа-фХIIа, связанный с поверхностью, способен вызывать свертывание, активируя фXI – считается, что эта реакция является основной в действии контактного пути на свертывание. Кроме того, альфа- и бета-формы фХIIа также способны медленно активировать фVII [39], однако при физиологических температурах эта реакция в плазме не проявляется из-за более быстрой инактивации фХIIа С1-ингибитором. При температурах, близких к 0 °С, достижимых, например, при длительном хранении собранной крови или при ее размораживании,

скорость инактивации падает, в результате чего проявляется эффект холодной активации свертывания [40]. Этот эффект может вызывать «фоновую» активацию свертывания даже в тех образцах, в которые не добавлен активатор внешнего или контактного пути, таким образом затрудняя проведение исследований свертывания в образцах плазмы, которые хранились при отрицательных температурах [41]. Дополнительно известно, что альфа-фХIIа независимо от своей протеолитической активности модифицирует структуру фибринового сгустка, связываясь тяжелой цепью с фибрином и защищая сгусток от фибринолиза [42]. С другой стороны, бета-субъединица фХIII, которая образуется под действием тромбина, ингибирует активацию фХIIа на анионных поверхностях [43]. Физиологическая важность этих эффектов *in vivo* не показана; возможно, их роль в процессе свертывания незначительна.

В целом, роль фХII в системе свертывания крови остается важным, но практически нерешенным вопросом [33]. Эта роль обсуждается с момента открытия в 1955 г., когда было обнаружено, что в стеклянной пробирке, стенки которой вызывают свертывание по контактному пути в нормальной плазме за несколько минут, плазма пациента Джона Хагемана не свертывалась [44]. При этом сам пациент с дефицитом фХII не страдал от кровотечений. Примечательно, что смерть Джона Хагемана, как и смерть Майме Вильямс, у которой был обнаружен дефицит другого белка контактного пути – ВМКГ, наступила от тромбоэмболии легочной артерии [45, 46]. Тогда считалось, что дефицит факторов контактного пути является фактором риска тромбозов, в частности, за счет нарушения активации фибринолиза. Так, при тромбозах было обнаружено понижение уровня факторов контактного пути [22]. Однако последнее наблюдение можно трактовать противоположным образом, если принять гипотезу, что контактный путь свертывания участвует в развитии тромбоза: при тромбозе, как и при других патологиях, связанных с участием контактного пути (системное воспаление, ангиоэдема и др.), возможны быстрая активация и последующее исчерпание факторов контактного пути.

В последнее десятилетие в работах Thomas Renné и коллег, которые создали модель дефицита фХII на нокаутных мышах, было показано, что при дефиците фХII лабораторные животные либо полностью защищены от развития индуцированного тромбоза, либо значительно слабее страдают от его последствий. Это открытие было проверено в дюжине работ на множестве различных экспериментальных моделей: на мышах, на крысах, кроликах и даже приматах, у которых дефицит фХII вызывали либо нокаутом гена, либо подавлением его экспрессии в гепатоцитах с помощью анти-смысловых олигонуклеотидов, либо применением прямых ингибиторов фХIIа и антител, подавляющих активность фХIIа (Таблица 1).

Таблица 1. Экспериментальные модели тромбообразования при дефиците фХII

	Линия животного (тип ингибирования)	Экспериментальная модель тромбоза	Источник
Мыши	C57Bl/6 (нокаут, Ab, инг)	FeCl ₃ -индуцированный тромбоз сонной артерии	[47 – 50]
	C57Bl/6 (нокаут, Ab)	Тромбоз сонной артерии индуцированный бенгальским розовым	[48, 50]
	129/SvJ (нокаут)	Лигирование сонной артерии	[51]
	C57Bl/6 (нокаут, Ab, инг)	Острый ишемический удар при окклюзии срединной церебральной артерии	[47, 52, 53]
	BALB/c (инг)	Безболевая ишемия мозга при введении в сонную артерию микрочастиц или микросгустков	[54]
	129/SvJ (нокаут); C57Bl/6 (нокаут, Ab)	Легочная тромбоэмболия, индуцированная коллагеном и эпинефрином или тканевым фактором	[48, 51]
	129/SvJ (нокаут); C57Bl/6 (инг)	Зажим брюшной аорты	[51, 55]
	129/SvJ (нокаут); C57Bl/6 (нокаут, инг); Swiss Webster (нокдаун)	FeCl ₃ -индуцированный тромбоз в артериоле брыжейки	[47, 51, 56]
	NMRI (инг)	Тромбоз в артериовенозном шунте	[55]
		Зажим верхней полой вены	[56]
BALB/c (нокдаун); NMRI (инг)	FeCl ₃ -индуцированный тромбоз полой вены	[55, 56]	
Крысы	CD (инг); Sprague Dawley (нокаут, нокдаун, инг)	FeCl ₃ -индуцированный тромбоз сонной артерии	[47, 57, 58]
	CD (инг)	Острый ишемический удар при окклюзии срединной церебральной артерии	[59]
	Sprague Dawley (нокаут, нокдаун, инг)	Тромбоз в артериовенозном шунте между сонной артерией и яремной веной	[57, 58]
Кролики	Chinchilla Bastard (инг)	FeCl ₃ -индуцированный тромбоз бедренной артерии; зажим яремной вены	[55]
	New Zealand (инг)	Тромбоз в артериовенозном шунте	[55, 57]
	New Zealand (нокдаун, инг)	Катетер-ассоциированный тромбоз в верхней полой вене	[38, 60]
	New Zealand (Ab)	Тромбоз в экстракорпоральном мембранном оксигенаторе между полой и брюшной венами	[49]
Обезьяна	Бабуин (Ab)	Коллаген-индуцированный тромбоз в бедренном артериовенозном шунте	[48, 61]

«нокаут» – мыши, нокаутные по гену фХII; «нокдаун» – животные, в которых подавлен синтез фХII, например, с помощью анти-смысловых олигонуклеотидов; «Ab» и «инг» – контактный путь подавлен антителами или прямыми ингибиторами к фХIIа, соответственно.

В этих работах тромбоз индуцировали в сосудах различного типа, например, в сонной артерии и бедренной вене, при помощи разных методов, включая ожог хлоридом железа (III) или механическое повреждение сосуда. С помощью чужеродных поверхностей филаментов, катетеров и шунтов вызывали образование и рост тромбов. В результате было показано, что дефицит фХII приводил к уменьшению массы тромба и объема поврежденной ткани, увеличивая выживаемость по сравнению с контролем при нормальном уровне фХII. Восстановление нормального уровня фХII у фХII-дефицитных животных приводило к развитию обширного тромбоза. Однако самым замечательным является то, что фХII, отвечая за патологическое тромбообразование, при этом не играет значительной роли в гемостазе [62]. При дефиците фХII у грызунов кровотечение из поврежденного уха, хвоста или почки останавливалось за такое же время, как в контрольной группе (Таблица 2). В большинстве работ, цитированных в Таблице 2, использовалась группа еще и с положительным контролем – животные с гепарином. В ней кровотечение либо останавливалось значительно дольше, либо не останавливалось вовсе в течение всего времени наблюдения, что говорит о корректной оценке плазменного гемостаза в использованных животных моделях. С другой стороны, окончательно не решен вопрос о корректности «переноса» на человека результатов исследований, которые были проведены, по большей части, на грызунах. Если действительно фХII не играет роли в гемостазе, но при этом непосредственно участвует в развитии тромбоза, встает вопрос о механизмах активации фХIIа в (пато)физиологических условиях и о его действии на систему свертывания.

Таблица 2. Экспериментальные модели гемостаза при дефиците фХII

	Линия животного (тип ингибирования)	Экспериментальная модель гемостаза	Источник
Мыши	129/SvJ (нокаут); C57Bl/6J (нокаут, Ab, инг)	Отрезание 3 мм кончика хвоста (модель хвостового кровотечения)	[47, 49, 51, 52]
	C57Bl/6 (Ab)	Отрезание участка хвоста при диаметре 1,5 мм	[53]
	BALB/c (нокдаун)	Кровотечение из хвостовой вены	[56]
Крысы	CD (инг)	Отрезание 3 мм кончика хвоста	[47]
	Sprague-Dawley (нокаут, нокдаун, инг)	Ногтевое кровотечение	[57, 58]
Кролики	New Zealand (Ab, инг)	Ногтевое кровотечение	[49, 57]
	New Zealand (Ab, инг); Chinchilla Bastard (инг)	Надрез почки и уха	[49, 55]

«нокаут» – мыши, нокаутные по гену фХII; «нокдаун» – животные, в которых подавлен синтез фХII, например, с помощью анти-смысловых олигонуклеотидов; «Ab» и «инг» – контактный путь подавлен антителами или прямыми ингибиторами к фХIIа, соответственно.

Одна из гипотез, объясняющая разное участие фХIIа в тромбозе и гемостазе, заключается в том, что при возникновении тромба и при образовании прокоагулянтных тромбоцитов последние секретируют из плотных гранул полифосфаты, которые и активируют фХII; наработанный фХIIа, в частности, запускает образование фибринового сгустка [63]. Согласно данной гипотезе, фХIIа не вносит значительного вклада в процесс свертывания в ране, т.е. в гемостаз, потому что в ране достаточно высока концентрация ТФ, запускающего свертывание по внешнему пути. Согласно другой гипотезе, фХII активируется вовсе не на полифосфатах, а на прокоагулянтной поверхности тромбоцитов, которая содержит ФС и пока не известный рецептор к фХII из альфа-гранул тромбоцитов (как было сказано выше, образованию тромбоцитов с ФС могут способствовать ферменты транслутаминазы). При этом в данной гипотезе предполагается, что фХIIа не влияет на свертывание в ране из-за быстрой инактивации С1-ингибитором, который дополнительно секретируется тромбоцитами; наоборот, в растущем тромбе секретируемый С1-ингибитор быстро вымывается потоком, что позволяет фХIIа, прикрепленному к тромбоцитам, обеспечивать образование фибрина [64]. Обе гипотезы могут объяснить различное влияние фХIIа на тромбоз и гемостаз, основываясь на различиях во внешних условиях, при которых происходит, с одной стороны, рост тромба и, с другой стороны, образование гемостатического сгустка; первая гипотеза основывается на разнице в концентрации ТФ, вторая – на разнице в скорости потока крови.

1.2.5. Эволюция контактного пути

На основании существующих знаний, фХII способствует развитию патологии (тромбоза) и является «бесполезным» для организма при поранении; такое противоречие говорит о явной неполноте современных представлений о том, в чем заключалась эволюционная «ценность» фактора XII и его роли в свертывании, которая обусловила его появление в ходе эволюции. Возможно, прояснить эту роль позволит изучение эволюции системы свертывания и контактного пути. Биоинформатические методы, такие как сравнение геномов организмов из клады *Chordata*, позволили выяснить, что общий предок XII появился еще у амфибий (*Amphibia*); при этом ген фХII был утерян в классе птиц (*Aves*). Предшественником гена фХII является ген активатора фактора роста гепатоцитов (HGFA), из которого он появился в результате полногеномной дупликации. Кроме него, также у амфибий появился ген, являющийся ортологом плазменного пре-калликреина и фХI. Разделение генов, кодирующих эти два белка: плазменный пре-калликреин и фХI (и, предположительно, возникновение связи между фХII и свертыванием), произошло относительно поздно – при появлении сумчатых млекопитающих (*Marsupialia*) [65].

При этом стоит отметить, что среди плацентарных млекопитающих у представителей отряда *Cetacea* (морских млекопитающих, таких как киты, дельфины и другие) гену фXII соответствует псевдо-ген, а активность фXII в крови отсутствует: при контакте их крови со стеклянной пробиркой не происходит активация свертывания [66]. Исходя из этого, можно предположить, что возникновение контактного пути свертывания могло придать некоторое эволюционное преимущество наземным млекопитающим; в частности, роль контактного пути могла быть связана с живорождением и возникновением плаценты. Возможная связь контактной активации свертывания, способствующей развитию тромбозов, с вынашиванием эмбриона у сумчатых и плацентарных млекопитающих подтверждается клиническими наблюдениями, которые показывают гиперкоагуляционное (т.е. протромботическое) состояние системы свертывания у беременных женщин [67].

1.3. Научно-практическое значение избирательного ингибирования контактного пути

1.3.1. Антикоагулянтное действие ингибиторов контактного пути

Исходя из описанного выше, ингибирование контактной активации свертывания может стать новой перспективной стратегией в анти-тромботической терапии. Ведь основным недостатком существующих препаратов против тромбозов, большинство из которых представляют собой ингибиторы тромбина и Ха (гепарин, ривароксабан, дабигатран) и подавляют как тромбоз, так и гемостаз, заключается в повышенном риске кровотечений, угрожающих жизни пациента [68, 69]. Создание новых лекарств на основе селективных ингибиторов фXIIa позволит исключить риск кровотечений при их применении [70]. Кроме прямого ингибирования фактора XIIa, подавление контактной активации может быть осуществлено другими путями: путем блокирования гидролиза связи Arg353–Val354 в фXII или путем блокирования сайта связывания фXI в альфа-фXIIa, путем связывания свободных ионов цинка или деградации полифосфатов и нуклеиновых кислот в крови, или добавлением положительно заряженных пептидов, конкурирующих с фXII за связывание с анионными поверхностями.

Важной проблемой также является подавление контактного пути свертывания для снижения тромбогенности новых перспективных материалов, которые вводятся или контактируют с кровотоком: например, углеродных нанотрубок, которые могут быть использованы для направленной доставки лекарств [71], или новых типов кровезаменителей, таких как перфторан [72, 73]. Кроме этого, когда кровь извлекают из кровеносного сосуда и она

контактирует с чужеродными поверхностями, подавление контактной активации необходимо, потому что она может препятствовать использованию образца плазмы или крови для хранения, трансфузии и исследования [74, 75]. При заборе крови в пробирку контактный путь активируется от поверхностей иглы, трубочек и стенок пробирки. При получении плазмы из замороженного образца путем оттаивания плазма некоторое время находится при температурах в диапазоне 0 – 10 °С, при которых возникает эффект холодной активации, который был описан выше. В результате контактной активации может инициировать спонтанное свертывание в пробирке, препятствующее дальнейшим манипуляциям с плазмой и подрывающее исследование свертывания [41].

1.3.2. Исследование динамики свертывания по внешнему пути

Проведение исследования свертывания *in vitro* подразумевает взятие крови у донора или пациента и получение плазмы, причем часто исследование проводится на образцах плазмы, которые предварительно хранились в замороженном виде. После получения плазмы в жидком виде непосредственно перед исследованием, в плазму добавляют активатор системы свертывания и исследуют, в основном, кинетику образования фибринового сгустка. В настоящее время наиболее информативными и распространенными методами исследования являются три так называемых «глобальных» теста гемостаза: тромбоэластография, тест генерации тромбина и тромбодинамика [76]. При исследовании тромбоэластографии и генерации тромбина активация свертывания происходит путем равномерного перемешивания плазмы с тканевым фактором, после чего непрерывно в течение некоторого времени измеряется либо изменение вязко-упругих свойств образующегося сгустка [77], либо скорость расщепления флуорогенного субстрата тромбина [78], соответственно. При исследовании тромбодинамики инициация свертывания осуществляется при контакте плазмы с поверхностью, на которой иммобилизован тканевый фактор, после чего непрерывно измеряется перемещение границы фибринового сгустка от этой поверхности вглубь плазмы [79]. Характерными параметрами, которыми описывается процесс свертывания в этих методах, являются лаг-тайм (время задержки свертывания, отсчитываемое от момента активации), максимальная амплитуда (концентрации тромбина или вязкости сгустка) и время достижения максимальной амплитуды, скорость распространения фронта сгустка и т.д.

Данные методы являются очень ценными для фундаментальных исследований свертывания, так как они отражают физиологический процесс свертывания в организме, а также для медицинской диагностики, потому что они позволяют распознать патологии гемостаза у пациента по отклонению описанных выше параметров от нормальных значений, характерных для

здоровых доноров [80]. При этом чувствительность этих методов к патологиям, например, к гемофилиям А, В и С (дефицитам факторов свертывания VIII, IX и XI, соответственно) [81], увеличивается при уменьшении концентрации активатора (тканевого фактора). Уменьшение концентрации ТФ приводит к увеличению лаг-тайма вплоть до десятков минут [77, 82]. Однако, при таких временах роль контактной активации от поверхностей пробирок или кювет становится значительной. Как было показано в тесте генерации тромбина и тромбоэластографии, контактная активация приводит к увеличению значений максимальной амплитуды и уменьшению времени свертывания в нормальной плазме [83 – 85]. В предельном случае, когда концентрация активатора нулевая, свертывание (по контактному пути) все равно происходит. Таким образом, контактный путь может вносить нежелательные искажения в результаты исследования и препятствовать адекватной оценке эффектов ТФ на свертывание, а также приводить к увеличению ошибок и к несоответствию результатов исследования. Серьезным последствием действия контактного пути является также потеря чувствительности диагностических тестов по отношению к патологическим состояниям свертывания.

Контактная активация свертывания часто не позволяет выявить лабораторными методами не только гипокоагуляционные состояния, возникающие из-за дефицитов гемостаза, но и гиперкоагуляционные, т.е. протромботические, состояния [86, 87]. Например, при исследовании тромбодинамики в плазме пациентов в состоянии гиперкоагуляции часто, с характерными временами 15 – 30 минут, возникают фибриновые сгустки, независимые от ТФ; их образование инициируется в областях плазмы, удаленных от поверхности с ТФ. В нескольких работах было показано, что в состоянии гиперкоагуляции ТФ-независимые сгустки образуются из-за циркулирующих в кровотоке микровезикул, активирующих фХIа [87], или из-за активации от клеточной стенки бактерий при сепсисе [88]. С другой стороны, такие же ТФ-независимые сгустки могут образоваться и в нормальной плазме доноров, в которой произошла контактная активация в процессе забора крови, получения плазмы и хранения образца. Также ТФ-независимые сгустки могут образоваться в процессе размораживания образца плазмы, который хранился в замороженном виде, вследствие холодовой активации. Этот эффект увеличивает фоновую активацию свертывания и затрудняет исследование размороженных образцов плазмы [7, 83]. Однако, если прямым ингибитором фХIIа заблокировать контактный путь на стадии подготовки плазмы к исследованию тромбодинамики, тогда ТФ-независимые сгустки не будут возникать в плазме здоровых доноров, а только в плазме пациентов в состоянии гиперкоагуляции [87, 88]. Таким образом, прямое ингибирование контактного пути позволит увеличить чувствительность методов исследования свертывания. Однако такой способ пока не приобрел широкого распространения.

На данный момент наиболее распространенным остается косвенный способ подавления контактного свертывания: при заборе крови в пробирку предварительно добавляют агент, хелатирующий ионы кальция (таким агентом являются цитрат натрия, ЭДТА и другие соединения с несколькими карбоксильными группами). Хелатирование кальция ингибирует мембранно-зависимые реакции образования фХа и тромбина. Из крови, содержащей хелатор, получают плазму (в большинстве случаев, при помощи центрифугирования); непосредственно перед исследованием свертывания в плазму добавляют избыток хлорида или ацетата кальция, чтобы концентрация свободных ионов кальция соответствовала физиологическому значению порядка 2 мМ, т.е. плазму рекальцифицируют. Вместе с кальцием в плазму часто добавляют один из активаторов свертывания (например, ТФ или активатор контактного пути), после чего проводят исследование. Такой способ подавления свертывания, с помощью хелатора, обладает некоторыми недостатками. Например, было показано, что хелатирование при заборе крови и последующая рекальцификация приводят к изменению динамики образования сгустка, наработки тромбина и агрегации тромбоцитов [89]. Более того, хелатирование не подавляет активацию фХI под действием фХIIa, который образуется в ходе заборе крови или при хранении [90]. В результате, после рекальцификации плазмы и добавления ТФ свертывание будет инициироваться не только по «внешнему» пути, но все же и по контактному пути из-за фактора ХIIa, образовавшегося ранее.

Итак, для корректного исследования гемостаза с использованием низких концентраций ТФ, для подавления контактной активации и связанных с ней артефактов исследования стоит использовать прямые ингибиторы фХIIa [83], причем такие ингибиторы должны быть высокоселективными по отношению к фХIIa: при концентрациях, при которых они эффективно подавляют контактное свертывание, не должно проявляться эффектов ингибиторов на остальные факторы свертывания.

1.4. Ингибиторы фактора ХIIa

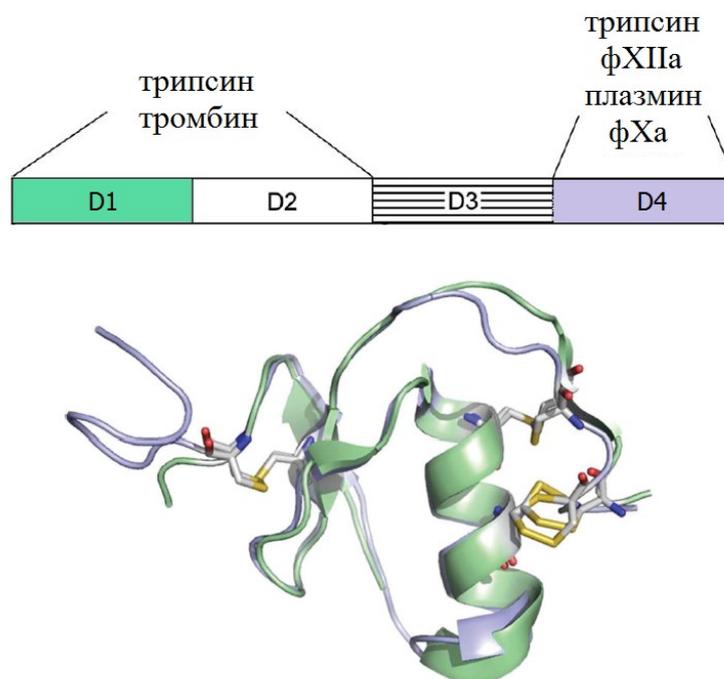
Фактор ХIIa, как и абсолютное большинство остальных факторов свертывания, принадлежит семейству S1 сериновых энтеропептидаз, в которое входят трипсин-подобные протеазы. Среди довольно большого количества (около полусотни) белковых ингибиторов фХIIa, большинство было изначально открыто именно как ингибиторы трипсина. Эти ингибиторы были выделены из самых разных организмов: из бактерии *E.coli* [91], из семян различных растений [92], из пищеварительного тракта кровососущих насекомых [93] и т.д. Ингибиторы представляют собой малые белки размером от 3 до 16 кДа, содержащие один или несколько дисульфидных

мостиков, и принадлежат пяти разным семействам. Каждое семейство ингибиторов выделяется, в первую очередь, по положению дисульфидных мостиков в структуре белка [94]. К числу ингибиторов фХIIа из семян растений относится кукурузный ингибитор трипсина, или КТИ [95], а также ингибиторы из растений семейства тыквенных: ингибиторы трипсина из *Cucurbita maxima*, СМТИ-III [96], *Luffa cylindrica*, LCTI-III [97], и другие. К числу ингибиторов из кровососущих насекомых относится, например, инфестин-4 [98]. Все известные ингибиторы фХIIа являются в разной степени неселективными, т.е. кроме фХIIа они ингибируют еще и другие факторы свертывания, что затрудняет их применение. «Селективность ингибитора к фХIIа относительно других, нецелевых протеаз» можно определить, как отношение наименьшей из констант ингибирования нецелевых протеаз к константе ингибирования целевой протеазы (фХIIа).

1.4.1. Инфестин-4

Последовательность, кодирующая инфестин-4, была обнаружена в кодирующей ДНК (кДНК), полученной из транскрипта пищеварительного тракта бразильского клопа *Triatoma infestans*. Полноразмерная кДНК инфестина кодирует 7 белковых доменов, каждый из которых является неклассическим ингибитором типа Казаля. Три N-концевых домена – это инфестины -1R, -2R и -3R; инфестин-1R ингибирует химотрипсин, нейтрофильную эластазу и субтилизин, но не ингибирует трипсин-подобные протеазы свертывания [99]. Инфестины -2R и -3R, а также четыре С-концевых домена, инфестины -1, -2, -3 и -4, каждый из которых имеет массу 5 – 6 кДа, наоборот, ингибируют протеазы свертывания. Схематическое расположение в транскрипте последовательностей, кодирующих С-концевые домены, показано на Рисунке 5. Для изучения ингибирующих свойств отдельных доменов авторы работ [93, 98] произвели рекомбинантный вариант инфестина-4, а также белок, включающий последовательно домены -1 и -2 («инфестин 1-2»). Оказалось, что домены -2R, -3R, -1 и -2 являются сильными ингибиторами тромбина, в то время как инфестин-4 ингибирует плазмин и фХа, а также конкурентно ингибирует фХIIа. Примечательно, что нативный белок массой 14 кДа, выделенный из организма *T. infestans*, ингибирует тромбин и трипсин и, наиболее вероятно, представляет собой инфестин 1-2 (Таблица 3). Гомология последовательностей инфестина-1 и инфестина-4, т.е. доля одинаковых аминокислотных остатков в позициях их полипептидных цепей, составляет всего 47 %. Несмотря на это и на разницу в ингибирующей активности инфестина-1 и инфестина-4, они обладают высокой степенью пространственной гомологии, как показано на Рисунке 5. Пространственные структуры инфестина-1 и инфестина-4 приведены в публичной базе данных Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>), номера записи 2F3C и 2ERW, соответственно. При наложении их

структуры почти полностью совпадают (значение среднеквадратичного расстояния между аналогичными атомами этих структурах составляет 0,78 Å), кроме области в реактивной, или протеаза-связывающей, петле (см. ниже).



```

Inf-4  EVRNPCACFRNYVPVCGSYDGKTYGNPCMLNCAAQTKVPGLKLVHEGRCQ-RSNVEQF
Dip-6  EVRNPCNCFRNFNPVCGTTDGKTYGNLCMLGCAAETKVPGLKLLHNGRCLPK---EQL
Brs-8  QVRNPCACFRNYLPVCGSSDGKTYGNPCMLNCAAHTKVPGLKLAHKGRQC-RSDVEQF
      :*****  ****:  ****:*****  ***.***  *****  *:***  .  .**:
```

Рисунок 5. Структура инфестина-4. Показано схематическое строение участка молекулы кДНК, кодирующего С-концевые домены D1, D2, D3 и D4 (инфестины -1, -2, -3 и -4), а также наложение трехмерных структур (дисульфидные мостики – желтым цветом) инфестина-1 (PDB ID 2F3C; зеленый цвет) и инфестина-4 (PDB ID 2ERW; синий) и выравнивание аминокислотных последовательностей инфестина-4 (Inf-4), дипеталогастина-6 (Dip-6) и бразилиензина-8 (Brs-8; желтым цветом в каждой позиции выделены аминокислоты со сходными физико-химическими свойствами). Адаптировано из [98, 100].

Таблица 3. Ингибирующая активность рекомбинантных инфестина 1-2 и инфестина-4, а также нативного белка, выделенного из *T. infestans*

Ингибитор	Константа ингибирования, нМ				
	трипсина	плазмина	фХIIa	фХа	тромбина
Нативный инфестин	2,0 ±0,7	н.и.	н.и.	н.и.	0,043 ±0,031
Инфестин 1-2	3,1 ±0,7	н.и.	н.и.	н.и.	0,025 ±0,007
Инфестин-4	11,0 ±8,6	2,1 ±0,8	0,128 ±0,016	53,0 ±22,2	н.и.

Показаны значения констант ингибирования в виде среднее ± ошибка среднего. «н.и.» – не ингибирует при концентрациях вплоть до 5 мкМ. Данные взяты из работ [93, 98].

Высокой степенью гомологии последовательностей с инфестином-4 (70 %) обладают два белка, дипеталогастин-6 и бразилиензин-8, которые были предсказаны по последовательности кДНК из транскриптома родственных представителей клопов: *Dipetalogaster maximus* [101] и *T. brasiliensis* [102], соответственно. Причем N-концевые домены, кодируемые транскриптами, в которых были обнаружены последовательности, соответствующие инфестину-4, дипеталогастину-6 и бразилиензину-8, представляют собой ингибиторы тромбина. К сожалению, последние два белка не были получены, поэтому не известна их ингибирующая активность. На примере инфестинов и других белков, гомологичных им, можно сделать вывод, что сильные ингибиторы факторов свертывания, обладающие некоторой степенью селективности, могут быть найдены в организмах кровососущих животных, которым для эффективного переваривания потребленной крови может быть выгодно сохранять ее в жидком виде [102].

Инфестин-4 в виде слитого белка с человеческим альбумином, экспрессированного в культуре клеток дрожжей, был исследован *in vivo* на мышах. Он, ингибируя фХIIa, подавлял индуцированный тромбоз и предотвращал эмболию сосудов, при этом он не оказывал ингибирующего влияния на гемостаз мышей [47]. Недавно было показано, что инфестин-4 эффективно препятствует развитию ишемии при окклюзии срединной церебральной артерии у крыс [59], а также было проведено более широкое исследование анти-тромботических свойств инфестины-4 в экспериментальных моделях тромбоза на мышах и кроликах [55]. Однако, в работе [57], проведенной на крысах и кроликах, все же было показано, что инфестин-4 не является абсолютно безопасным препаратом; кроме подавления тромбоза, он вызывал удлинение кровотечения (подавление гемостаза) при повреждении ногтевого ложа у экспериментальных животных. Скорее всего, этот эффект на гемостаз связан с недостаточной селективностью инфестины-4 к фХIIa: он ингибирует фХа, а также ряд других протеаз свертывания. Значение концентрации, ингибирующей активность человеческого фХа на 50 %, т.е. IC_{50} , составляло 0,2 мкМ [57], в то время как ранее была опубликована константа ингибирования K_i против фХа, равная 0,05 мкМ [98]. Такая неспецифическая активность может препятствовать использованию инфестины-4 в фундаментальных исследованиях и практических приложениях. Кроме того, было недостаточно изучено, какой ингибирующей активностью к протеазам свертывания обладает инфестин-4 при высоких концентрациях, более 1 – 10 мкМ.

Для повышения селективности ингибирования фХIIa инфестином-4 в работе [100] был сделан поиск среди всевозможных последовательностей протеаза-связывающей петли, которые отбирались по связыванию с фХIIa. Было выбрано несколько мутантных вариантов инфестины-4, которые были наработаны в штамме дрожжей *Pichia pastoris* GS115 и которые ингибировали фХIIa и не ингибировали такие нецелевые протеазы, как фХа и плазмин. Среди них – мутанты

Mut15 и Mut3; в них, в частности, внесена аминокислотная замена Asn11Arg, а также Phe9 заменена на Thr в Mut15 и на Ser в Mut3. С другой стороны, осталась неизвестной активность этих мутантов инфестина-4 против ряда факторов свертывания (фXIа, фIXа, фVIIа, тромбин, аПС и т.д.). Более того, не был проанализирован возможный механизм, отвечающий за потерю неспецифической активности мутантов против нецелевых протеаз.

1.4.2. Кукурузный ингибитор трипсина

Одним из наиболее селективных ингибиторов фXIIа является КТИ. Это белок массой 14 кДа, состоящий из 127 аминокислот, который относится к семейству злаковых ингибиторов сериновых протеаз [95]. Как и другие представители этого семейства, полноразмерный КТИ является как ингибитором трипсина (по меньшей мере, есть один сайт связывания с трипсином – протеаза-связывающая петля между остатками Gly30 и Arg43), так и ингибитором альфа-амилаз (сайт связывания с амилазой находится на С-конце ингибитора) (Рисунок 6).

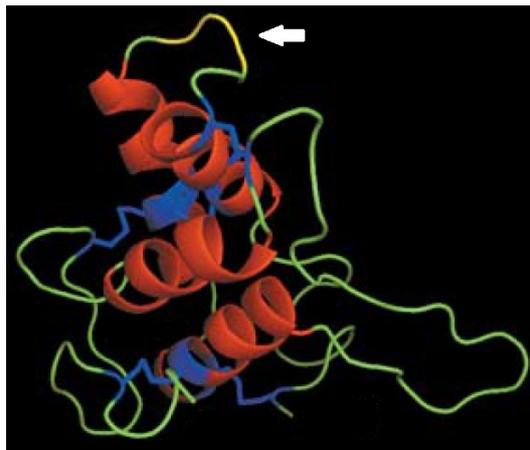


Рисунок 6. Трехмерная структура КТИ. Альфа-спиральные участки молекулы показаны красным цветом, цистеины, образующие дисульфидные мостики – синим, петельные участки – зеленым. Протеаза-связывающая петля КТИ показана желтым цветом и отмечена стрелкой. Адаптировано из [103].

Предполагается, что физиологическая функция КТИ заключается в защите семян от действия трипсинов (и амилаз) паразитических грибов [104]. Так, например, содержание КТИ в зернах коррелирует с устойчивостью к вредителям [105]. В дополнение, КТИ конкурентно ингибирует трипсин-подобную протеазу фXIIа с константой порядка 1 нМ. КТИ часто применяют для ингибирования контактной активации, когда исследуют свертывание по пути ТФ, в частности, в глобальных тестах гемостаза [83]. Также КТИ используют для покрытия чужеродных поверхностей, контактирующих с кровью, для увеличения их биосовместимости [38]. Тем не менее, известно несколько недостатков КТИ, связанных с неспецифической

активностью ингибитора. Так, было предположено, что КТИ может ингибировать тПА и задерживать процесс фибринолиза [84]. Более того, недавно было показано, что КТИ является еще и слабым ингибитором фХIа [106].

1.4.3. Ингибитор трипсина из тыквы СМТИ-III

Из семян тыквы было выделено несколько изоформ ингибитора трипсина, большинство из которых относится к семейству «squash». Наиболее активная изоформа, СМТИ-III, состоит из 29 а.о. и имеет массу 3,3 кДа; изоэлектрическая точка ингибитора равна 8,3. Этот ингибитор ингибировал трипсин с константой порядка 0,1 нМ и фХIIа с константой порядка 1 – 10 нМ и не ингибировал тромбин и калликреин [107 – 110]. Для другой изоформы, СМТИ-I, которая отличается от СМТИ-III одной заменой Lys9Glu и имеет в 60 раз меньшую активность к фХIIа, чем СМТИ-III [92], была получена трехмерная кристаллическая структура [111] и было выяснено, что в данном ингибиторе расщепляемая связь находится между остатками Arg5 – Пе6; ингибитор имеет три дисульфидные связи: Cys3 – Cys20, Cys10 – Cys22 и Cys16 – Cys28, и первые два дисульфида скрепляют разные стороны протеаза-связывающей петли с «каркасом» ингибитора (Рисунок 7).

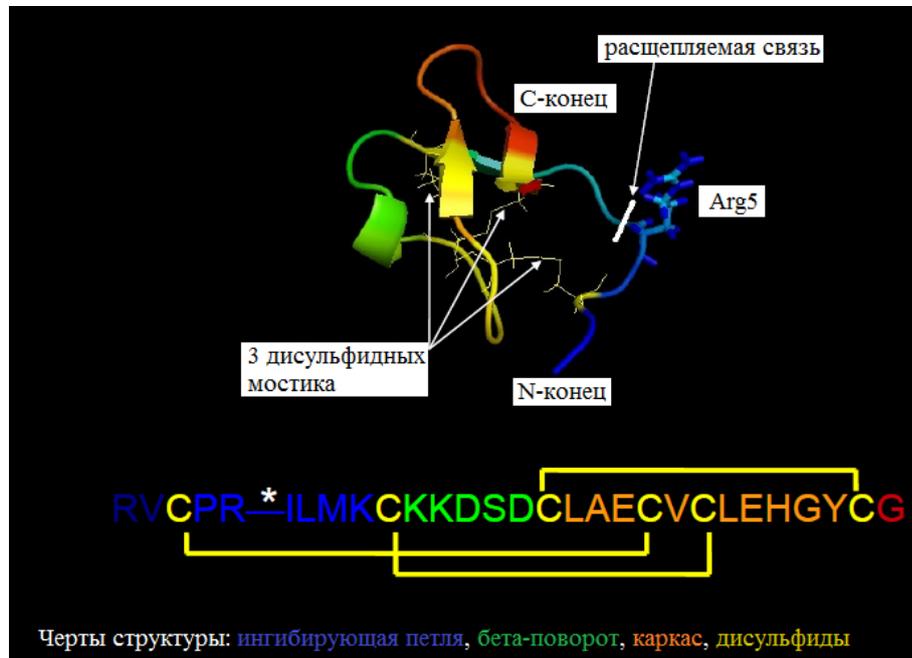


Рисунок 7. Трехмерная структура, аминокислотная последовательность и отдельные черты тыквенного ингибитора СМТИ-I (PDB ID 1LU0; [112]), являющегося природным Lys9Glu мутантом СМТИ-III. Окраска трехмерной структуры изменяется от N- к С-концу; окраска последовательности отражает черты структуры: синий цвет – протеаза-связывающая петля, зеленый – бета-поворот, оранжевый – остальная часть «каркаса», желтый – дисульфидные мостики (обозначены рамкой и отмечены стрелками).

Часть петли, которая ближе к N-концу, чем расщепляемая связь, связана с «каркасом» еще и водородной связью между Val2 и Glu19, а та часть петли, которая ближе к C-концу, связана водородной связью между Met8 и Cys28. Дополнительная водородная связь может образовываться в ингибиторе между остатками His25 и Tyr27 при значениях pH выше 6,0. При образовании комплекса с трипсином, с ним взаимодействуют 13 из 29 остатков ингибитора.

Ингибитор из тыквы был получен в виде рекомбинантного белка в нескольких экспрессионных системах. Так, в штамме *E. coli* JM109 белок СМТИ-I Met8Leu (эта мутация приводит к двукратному падению активности ингибитора), слитый со свиной аденилат киназой, нарабатывался в тельцах включения, а после денатурации СМТИ-I отщеплялся цианоген бромидом по остатку Met, который был вставлен в линкер между белками. После рефолдинга СМТИ-I приобретал ингибирующую активность к трипсину (K_i 0,14 нМ). При помощи поочередной замены аминокислот в протеаза-связывающей петле на аланин было показано, что во взаимодействии этого ингибитора с протеазой важную роль играют гидрофобные остатки петли [113]. Такая же схема очистки, отщепления и рефолдинга была использована в работе [114] для экспрессии СМТИ-III в виде слитого белка с гидрофобным пептидом LE1413. В работе [115] был создан рекомбинантный, N¹⁵ меченый СМТИ-III, который экспрессировался в штаммах *E. coli* JM109 и BL21 с вектора pGEX-2T в виде слитого белка с глутатион-S-трансферазой (GST); чистый выход белка, отщепленного от GST тромбином, составлял 2 – 5 мг с 1 литра культуры. Было установлено, что в комплексе с трипсином при равновесии наблюдается соотношение гидролизованной формы СМТИ-III к интактной форме, равное 2,4.

Мутагенезом протеаза-связывающей петли СМТИ-I Met8Leu было показано, что замена Pro4 в позиции P² на Ser или Gly приводит к 10 – 30-кратному повышению эффективности связывания с калликреином и фХа, но также и к 20-кратному падению связывания с фХIIа [114]. В работе [116] была изучена активность к протеазам свертывания целого ряда ингибиторов, относящихся к высококонсервативному семейству тыквенных, в том числе СМТИ-III и LCTI-III. LCTI-III был самым активным ингибитором фХIIа (K_i 3,8 нМ), СМТИ-III был менее активен (K_i 3,8 нМ). СМТИ-III и LCTI-III также слабо ингибировали амидолитическую активность к хромогенному субстрату плазменного калликреина (K_i 130 мкМ и 38 мкМ, соответственно) и фХа (K_i 23 мкМ и 100 мкМ, соответственно); на активность других изученных протеаз (XIа, IXа, VIIа, тромбин) ингибиторы не влияли. Согласно работе [116], селективность к фХIIа для СМТИ-III и LCTI-III составила 3×10^2 и 1×10^4 , соответственно. СМТИ-III и LCTI-III (10 мкМ) также ингибировали на 30 – 40 % активацию фХа комплексом внутренней теназы (фIXа и фVIIа). При этом СМТИ-III (50 мкМ) удлинял время свертывания в плазме по контактному пути на 60 %, а LCTI-III – только на 20 %; кроме того, эти ингибиторы не вызывали изменений во времени

свертывания при активации высокой концентрацией ТФ. С одной стороны, на основании известных данных тыквенные ингибиторы могут быть рассмотрены как эффективные и селективные ингибиторы амидолитической активности фХIIа. С другой стороны, эффективность ингибирования контактного пути в плазме крови с помощью таких ингибиторов остается неясной. Также практически не изучено, как может повлиять слабая неспецифическая активность СМТИ-III и LCTI-III на систему свертывания в целом и на различные ее компоненты. На данный момент, использование тыквенных ингибиторов не получило широкого применения.

1.4.4. Создание новых ингибиторов фактора ХIIа

Для подавления контактной активации было специально разработано несколько моноклональных антител. Антитело клона 15Н8 против N-концевого участка фХII блокировало его превращение в альфа-фХIIа и приводило к подавлению индуцированного тромбоза на мышцах и к уменьшению тромбогенности сосудистого шунта на приматах [61]. Аналогичный эффект на животных вызывало антитело 14Е11, которое, связываясь с фХI, блокировало его активацию фактором ХIIа [48]. Другое антитело, 3F7, с высокой селективностью ингибировало фХIIа, связываясь с каталитическим карманом протеазы, и подавляло индуцированный тромбоз у мышей и кроликов, а также на приматах уменьшало тромбогенность системы экстракорпоральной мембранной оксигенации в сердечно-легочном шунте [49]. Использование моноклональных антител позволяет достичь высокой селективности к фХIIа, однако их применение связано с такими практическими трудностями, как специальные условия хранения и необходимость внутривенного введения в организм [117].

Еще одной стратегией подавления контактной активации стал поиск ингибиторов фХIIа в библиотеках последовательностей ДНК- и РНК-аптамеров. В работе [118] была использована библиотека из 1014 последовательностей РНК, из которой был выбран аптамер R4сХII-1. Этот РНК-аптамер связывается с фХIIа с константой диссоциации K_D 0,5 нМ и специфически ингибирует контактный путь свертывания в плазме с эффективной концентрацией IC_{50} 0,3 мкМ (Таблица 4). Механизм действия R4сХII-1 отличается от прямого ингибирования фХIIа; этот аптамер не влияет на активность фХIIа ни к низкомолекулярному субстрату, ни к физиологическому субстрату пре-калликреину. R4сХII-1 ингибирует активацию фХI фактором ХIIа (константа ингибирования K_i 1 нМ), а также полностью блокирует авто-активацию фХII от декстран сульфата и стекла и частично ингибирует авто-активацию от каолина и эллаговой кислоты. Было предположено, что ингибирование аптамером осуществляется через связывание с сайтом для фХI и анионных поверхностей, который находится на N-концевом участке фХII или

на тяжелой цепи альфа-фХIIа. Аптамерные ингибиторы более удобны, чем антитела, с точки зрения практического применения; более того, их преимуществом является возможность легкого создания антидотов на основе последовательностей, комплементарных аптамеру [119]. Аптамеры широко применяются для создания новых антикоагулянтов; так, на их основе был создан целый ряд ингибиторов тромбина [120, 121]. Основная проблема использования аптамеров – довольно короткое время жизни в плазме, решается, в частности, путем «пришивания» к аптамерам различных высокомолекулярных соединений (например, полиэтиленгликоля).

Таблица 4. Константы ингибирования, K_i , фактора ХIIа

Ингибитор	K_i	Источник
КТИ (из <i>Zea mays</i>)	1 нМ	[95]
Инфестин-4 (из <i>Triatoma infestans</i>)	78 пМ	[93]
СМТИ-III (из <i>Cucurbita maxima</i>)	70 нМ	[116]
LCТИ (из <i>Luffa cylindrica</i>)	3,8 нМ	
МСТИ-I (из <i>Momordica charantia</i>)	13 нМ	
МСТИ-II (из <i>M. charantia</i>)	56 нМ	
МСТИ-III (из <i>M. charantia</i>)	1,6 мкМ	
МCoТИ-II-QRFR 6 (из <i>M. cochinchinensis</i>)	0,5 мкМ	[122]
mAb 3F7	6 нМ	[49]
аптамер R4сХII-1	1 нМ	[118]
бициклический пептид FXII618	22 нМ	[106]

«mAb» – моноклональное антитело. В скобках указан организм, из которого выделены природные ингибиторы.

Новые ингибиторы фХIIа также были разработаны методом пептидного фагового дисплея и поиска в библиотеках циклических пептидов размером до 10 аминокислот. Например, новый би-циклический пептид FXII618, конкурентно ингибирующий фХIIа с константой K_i 22 нМ, был отобран в несколько стадий по связыванию с бета-фХIIа различных пептидов с общей формулой Хаа – Cys – (Хаа)₄ – Cys – (Хаа)₄ – Cys – Хаа, где Хаа – варьируемая аминокислота [106]. Участок пептида, связывающийся с протеазой, имеет последовательность Phe-Arg-Leu-Pro. Кроме фХIIа, пептид не ингибировал другие протеазы свертывания вплоть до концентрации 50 мкМ. FXII618 был изучен в плазме крови *in vitro*, он специфически ингибировал генерацию тромбина по контактному пути и удлинял время свертывания.

Все наиболее активные ингибиторы фХIIа, большая часть которых действует по конкурентному механизму [123], приведены в Таблице 4. На данный момент известно очень мало низкомолекулярных не-пептидных ингибиторов фХIIа, причем такие ингибиторы обладают довольно низкой активностью и слабой избирательностью к фХIIа. Один такой ингибитор, представляющий собой 3-карбоксамид кумарин, ингибировал фХIIа с константой 4 мкМ [124]. Его селективность к фХIIа относительно тромбина, фХа, комплекса фVIIа – ТФ и калликреина составляла более 10, хотя концентрации ингибитора выше 50 мкМ не исследовались. В недавней работе этой же группы было синтезировано и исследовано другое соединение, производное 2,5-дихлорфенила, ингибирующее фХIIа с эффективной концентрацией 5 мкМ и не ингибирующее тромбин, фХа и калликреин при концентрациях вплоть до 50 мкМ [125]. Эффективная стратегия поиска низкомолекулярных ингибиторов может быть применена в случае, когда известна трехмерная кристаллическая структура целевой протеазы. Эта стратегия заключается в виртуальном отборе соединений, связывающихся с каталитическим карманом протеазы, на основе вычислительных методов докинга и молекулярной динамики [126 – 128]. После отбора потенциальных ингибиторов *in silico* они синтезируются, и их активность проверяется *in vitro*. К сожалению, единственная известная трехмерная структура каталитического домена фХIIа соответствует неактивной конформации протеазы, поэтому до сих пор не существует эффективных синтетических ингибиторов фХIIа [25].

1.4.5. Проблема эффективности ингибирования фактора XIIа

Создание новых ингибиторов контактной активации должно удовлетворять нескольким требованиям. Ингибитор, устраняющий артефакты контактной активации при проведении исследования свертывания, должен иметь высокую селективность к фХIIа по сравнению с остальными факторами свертывания; подавление контактного пути не должно сказываться на свертывании по пути тканевого фактора. Подавление активности фХIIа *in vivo*, являющееся частью анти-тромботической терапии, не должно сопровождаться значительным влиянием на другие компоненты свертывания, фибринолиза, воспаления и калликреин-кининовой системы.

Исходя из указанных требований, для существующих ингибиторов фХIIа можно сформулировать проблему, связанную с их влиянием на систему свертывания крови. В-первых, эта проблема касается эффективности ингибирования контактной активации; если константа ингибирования фХIIа в буферном растворе больше 10 нМ, то такой ингибитор слабо ингибирует контактную активацию в плазме. Эффективные концентрации слабых ингибиторов в плазме, как правило, больше 50 мкМ [116, 129], что для белкового ингибитора соответствует концентрации

в плазме порядка 1 г/л. В данном случае эта концентрация слишком высокая; далеко не для всех белков растворимость в плазме выше этой концентрации.

Во-вторых, проблема заключается в недостаточной селективности ингибиторов. Ингибиторы, для которых K_i против фХIIа порядка 1 нМ и менее, имеют эффективные концентрации в плазме порядка 1 – 10 мкМ. Значительную разницу (более 10^3) между величиной K_i , измеренной с помощью низкомолекулярного субстрата в буферном растворе, и эффективной концентрацией ингибирования контактной активации в плазме можно объяснить следующим: 1) в нормальной плазме уровень фХII (0,3 мкМ) много больше, чем K_i таких ингибиторов против фХIIа; 2) в плазме присутствует довольно много физиологических субстратов фХIIа, которые могут конкурировать с ингибитором за связывание с протеазой. При использовании небелковых ингибиторов играют роль и другие факторы; эффективная концентрация в плазме для низкомолекулярных ингибиторов повышается на один или несколько порядков из-за связывания с сывороточным альбумином, а для ингибиторов из ДНК и РНК – из-за действия ферментов нуклеаз. Таким образом, контактная активация в плазме крови предотвращается только микромолярными концентрациями сильного ингибитора фХIIа. В случае, если такой ингибитор имеет слабую неспецифическую активность против какой-нибудь другой протеазы свертывания, ингибируя ее с константой порядка 1 мкМ (соответствует значению селективности, равному 10^3), тогда в плазме концентрации 1 – 10 мкМ такого ингибитора могут подавлять не только контактный путь свертывания, но и другие реакции, участвующие в процессе свертывания в организме. Отсюда можно сделать вывод, что для специфического ингибирования контактного пути ингибитор фХIIа должен иметь селективность, по крайней мере, выше 10^3 , желательно, 10^4 и более. Однако, подавляющее большинство природных ингибиторов фХIIа не имеют такую высокую степень селективности. Для разрешения сформулированной проблемы далее рассмотрим известные механизмы ингибирования сериновой протеазы и те факторы, которые определяют активность и селективность белкового ингибитора.

1.5. Канонический механизм ингибирования сериновых протеаз

Большинство из рассмотренных выше ингибиторов, в том числе КТИ и инфестин-4, связываются своим петельным участком (протеаза-связывающей петлей) с активным центром протеазы (трипсина, фХIIа) подобно субстрату этих протеаз [123]. Аналогично петельному участку субстрата, петля ингибитора расщепляется в активном центре протеазы, однако, гидролиз расщепляемой пептидной связи в случае ингибитора является обратимой реакцией с константой равновесия, близкой к единице. Для лучшего понимания механизма действия

субстрат-подобных ингибиторов, вначале рассмотрим механизм гидролиза пептидной связи в субстрате.

1.5.1. Механизм расщепления пептидной связи в активном центре протеазы

Основываясь на данных рентгеноструктурного анализа комплексов протеазы с субстратом или субстрат-подобным ингибитором, предполагается следующий механизм гидролиза пептидной связи. Вначале происходит нековалентное связывание (электростатическое и ван-дер-ваальсово взаимодействие, образование водородных связей) протеаза-связывающей петли субстрата с активным центром протеазы. Это связывание сопровождается образованием так называемого «Михаэлисова комплекса». В этом нековалентном комплексе остаток ингибитора в позиции P^1 (по нумерации остатков, введенной в работе [130], это ближайший N-концевой остаток относительно расщепляемой связи, которая обозначается как $P^1 - P^1'$) связывается с остатком в $S1$ кармане протеазы. Трипсин-подобные протеазы содержат в этом кармане отрицательно заряженный остаток (обычно, Asp), поэтому они обладают протеолитической активностью к таким субстратам или ингибиторам, у которых в позиции P^1 содержится положительно заряженный остаток (Arg или Lys). Вторым характерным взаимодействием между протеаза-связывающей петлей и активным центром является образование антипараллельного бета-слоя между остатками субстрата в позициях $P^3 - P^1$ и участком фермента между остатками в позициях 214 – 216 (нумерация по химотрипсину).

В остатке P^1 карбонильный кислород расщепляемой пептидной связи образует водородные связи с атомами N остатков протеазы Gly193 и Ser195; эти атомы азота формируют оксианион-связывающий центр в каталитическом кармане (Рисунок 8). Результатом образования перечисленных связей, которые характерны практически для всех комплексов протеазы с субстратом или ингибитором, является точное расположение расщепляемой связи вблизи от каталитических остатков протеазы. Каталитическую триаду сериновой протеазы составляют остатки Ser195, His57 и Asp102 (нумерация по аминокислотной последовательности трипсина). Для прохождения дальнейшей реакции гидролиза необходимо, чтобы атом O^γ каталитического Ser находился на расстоянии 2 – 4 Å от карбонильного углерода расщепляемой связи [131, 132]. После образования Михаэлисова комплекса происходит перенос протона на каталитический His и нуклеофильная атака атома O^γ каталитического Ser на карбонильный углерод. Результатом этой реакции является образование ковалентного промежуточного комплекса между протеазой и субстратом (тетраэдрического интермедиата, в котором карбонильный углерод образует ковалентные связи с 4 атомами) (Рисунок 8). В случае обычных субстратов этот комплекс

является короткоживущим; в ходе переноса протона с каталитического His на атом N остатка субстрата P1' (ближайший С-концевой остаток относительно расщепляемой связи) расщепляемая связь разрывается, и тетраэдрический интермедиат превращается в ковалентный ацил-ферментный комплекс между протеазой и N-концевой цепью субстрата. При этом на С-концевой цепи субстрата образуется новый N-конец, который либо остается слабо, нековалентно связанным с каталитическим карманом, либо диссоциирует и отходит от протеазы [133, 134].

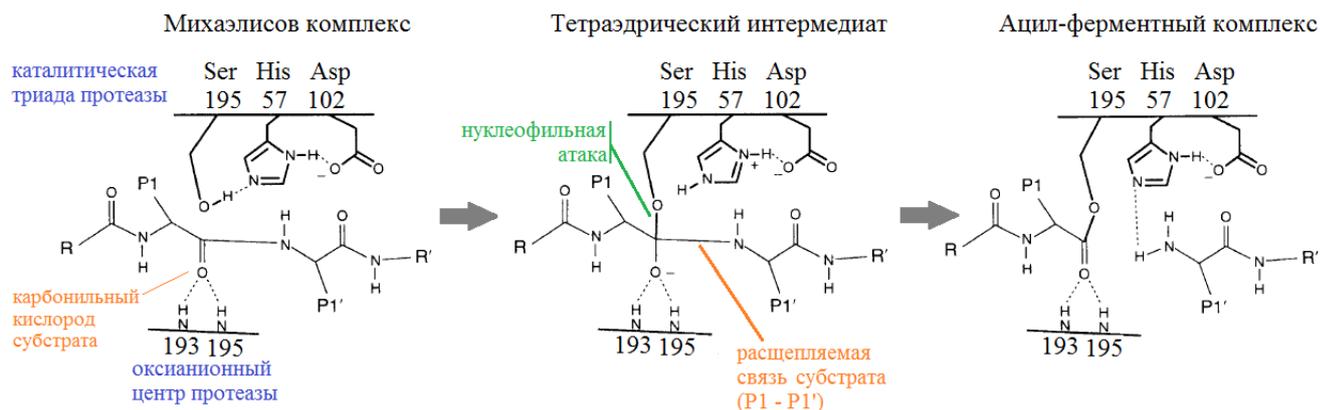


Рисунок 8. Промежуточные стадии расщепления пептидной связи субстрата в активном центре сериновой протеазы: 1) образование нековалентного комплекса Михаэлиса; 2) нуклеофильная атака каталитического серина на карбонильный углерод расщепляемой пептидной связи и формирование тетраэдрического интермедиата; 3) гидролиз связи с образованием ковалентного ацил-ферментного комплекса и переход протона с каталитического гистидина на карбонильный азот субстрата. Фиолетовым цветом показаны каталитические остатки протеазы (нумерация по трипсину) и остатки протеазы, чьи атомы азота формируют оксианионный центр, ориентирующий карбонильный атом кислорода пептидной связи субстрата в таком положении, которое способствует расщеплению пептидной связи. Адаптировано из [133].

В ходе дальнейших реакций происходит нуклеофильная атака молекулы воды на связь в ацил-ферментном комплексе, которая приводит к ее гидролизу, восстановлению каталитического Ser и образованию нового С-конца на N-концевой цепи субстрата. В итоге, описанные реакции приводят к гидролизу пептидной связи субстрата сериновой протеазы.

1.5.2. Канонические ингибиторы

Связывание с сериновыми протеазами «канонических» ингибиторов подобно связыванию субстратов. «Каноническими» называются ингибиторы, которые действуют по так называемому «стандартному» механизму, который заключается в стабилизации комплекса протеаза-ингибитор и в предотвращении гидролиза протеаза-связывающей петли [123]. При связывании канонических ингибиторов за счет оксианионного центра протеазы стабилизируется

тетраэдрический интермедиат. И даже если пептидная связь расщепляется и образуется ацил-ферментный комплекс между протеазой и каноническим ингибитором, то новообразованный N-конец петли остается связанным с каталитическим карманом, затрудняя нуклеофильную атаку молекулой воды. Достаточно прочное нековалентное связывание расщепленной петли ингибитора с карманом протеазы приводит к тому, что расщепленная связь синтезируется заново (происходит обратная реакция). Протекание обратной реакции является основным отличием канонического ингибитора от субстрата. С точки зрения ферментативной кинетики, прочное обратимое связывание канонического ингибитора с протеазой часто характеризуется константой диссоциации порядка 1 нМ и менее; при этом характерное время гидролиза ингибитора может достигать нескольких лет (!), что в 10^7 раз больше времени гидролиза субстрата [135, 136]. При этом гидролиз петли не приводит к полной потере ингибирующей активности; как одноцепочечная (нерасщепленная), так и двуцепочечная (расщепленная) формы ингибитора могут обладать ингибирующей активностью [123].

Стабилизация (даже расщепленной) петли ингибитора в активном центре осуществляется благодаря особой структуре канонических ингибиторов. Абсолютное большинство таких ингибиторов представляют собой однодоменные малые белки, размером 2 – 15 кДа, которые состоят из «каркаса», обладающего большой жесткостью за счет дисульфидных мостиков (от 1 до 8 дисульфидов в одной молекуле ингибитора), а также из относительно гибкой протеаза-связывающей петли, связанной с каркасом сетью внутримолекулярных связей [94, 130]. Петля ингибитора замыкается с одного или двух концов дисульфидными мостиками, которые удерживают ее на каркасе [137]; в некоторых случаях, петля связана с каркасом только водородными связями и электростатическими взаимодействиями [138] (Рисунок 9).

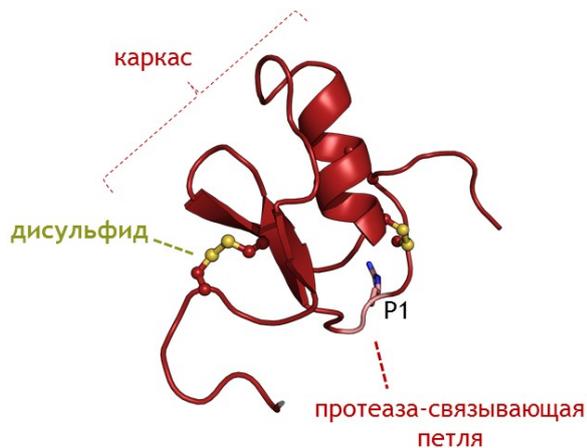


Рисунок 9. Структура канонического ингибитора (на примере инфестина-4; PDB ID 2ERW). Показан каркас ингибитора и протеаза-связывающая петля, на которой отмечен остаток в позиции P¹. Желтым цветом показаны дисульфидные мостики, замыкающие петлю на каркасе ингибитора.

Если ингибитор свободен, т.е. не связан с протеазой, то петля может быть достаточно подвижной. Однако при образовании комплекса с протеазой петля ингибитора становится жесткой и, более того, принимает строго определенную, «каноническую» конформацию. В комплексе конформация участка петли между остатками $P^3 - P^{3'}$ очень консервативна для всех канонических ингибиторов вне зависимости от последовательности этого участка и топологии всего ингибитора, от сериновых протеаз, которые они ингибируют, и от организма, из которых выделен ингибитор. Для иллюстрации, на Рисунке 10А показано наложение основной полипептидной цепи участка $P^3 - P^{3'}$ петли для нескольких различных ингибиторов.

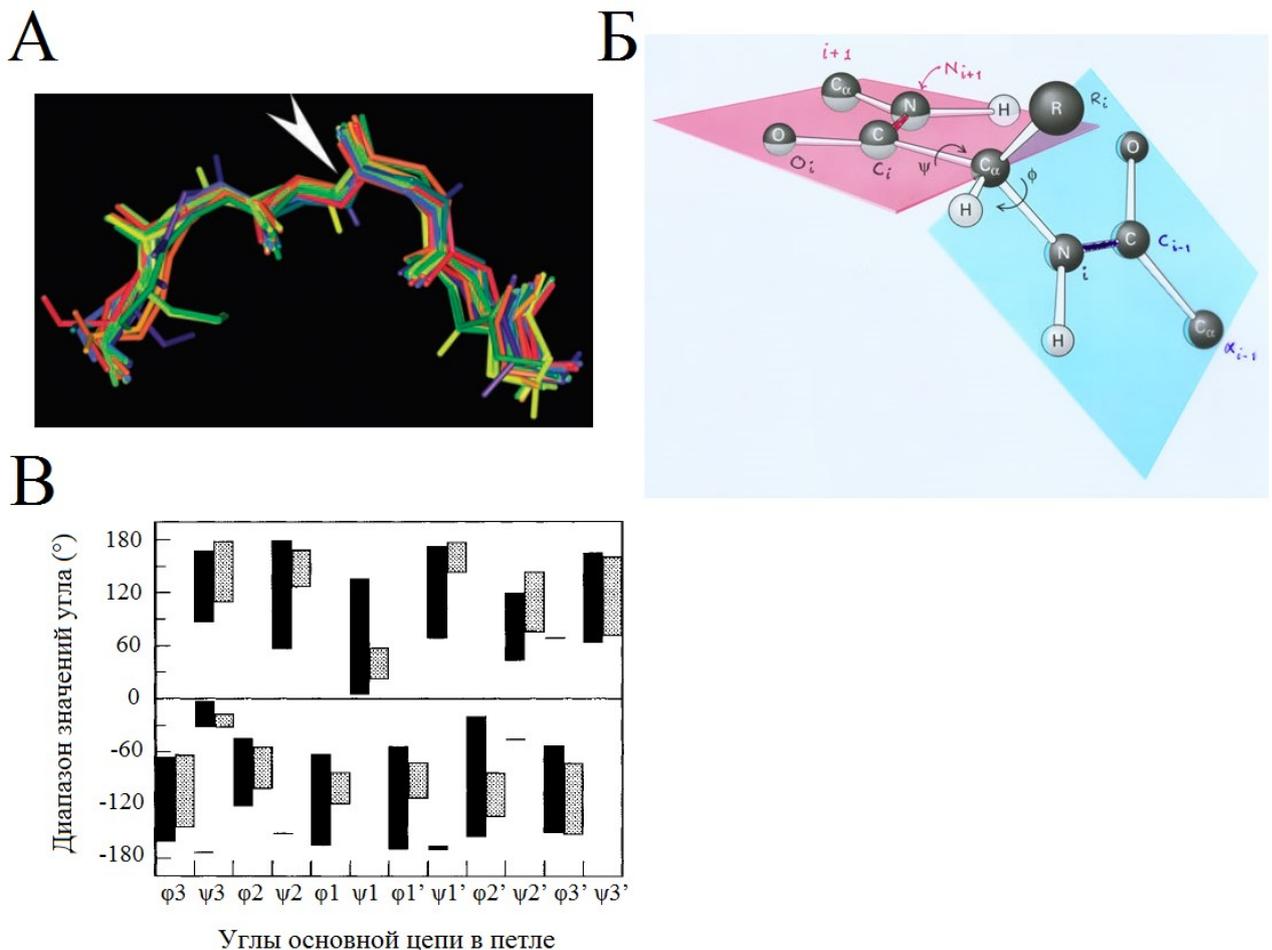


Рисунок 10. Каноническая конформация петли ингибиторов. (А): Наложение полипептидной цепи участка петли для 23 ингибиторов, относящихся к 12 различным семействам. Структуры взяты из комплексов с 9 различными сериновыми протеазами, включая химотрипсин и субтилизин. Расщепляемая пептидная связь отмечена белой стрелкой. Адаптировано из [135]. (Б): Обозначены атомы в (i-1)-ом, i-ом и (i+1)-ом остатках полипептидной цепи белка, а также торсионные углы ϕ_i и ψ_i . Адаптировано из [139]. (В): Диапазоны значений для углов ϕ и ψ , характеризующих поворот пептидных связей, на участке петли $P^3 - P^{3'}$ канонических ингибиторов, находящихся в свободной форме (черные столбцы) или в комплексе с протеазой. Диаграмма построена на основе структур 14 свободных ингибиторов из 9 семейств и 26 комплексов протеаза-ингибитор (ингибиторы из 8 семейств, входящие в комплекс с 10 сериновыми протеазами). Адаптировано из [140].

Каноническая конформация петли описывается следующими фиксированными характеристиками: 1) одинаковым во всех ингибиторах расстоянием между остатками в петле $P^3 - P^{3'}$ (среднеквадратичное отклонение между положениями атомов петли в разных ингибиторах не более 1 Å); 2) одинаковыми во всех ингибиторах значениями торсионных углов ϕ и ψ , описывающих поворот пептидных связей относительно друг друга в позициях $P^2 - P^{2'}$ (в связанных ингибиторах среднеквадратичное отклонение углов от 10° до 30° , а в свободных ингибиторах – около 40°) (Рисунок 10Б, В); 3) одинаковыми во всех ингибиторах углах χ_1 (-60°) и χ_2 (180°), описывающих вращение боковой цепи остатка Arg в позиции P^1 , а также одинаковым значением угла χ_1 (-180°) в позиции $P^{2'}$ [140]. Кроме того, комплексы канонического ингибитора и сериновой протеазы характеризуется одинаковыми для всех ингибиторов расстояниями между $C\alpha$ атомами в позициях $P^4 - P^{3'}$ ингибитора и $C\alpha$ атомом каталитического Ser195 протеазы. В работе [135] на основании рентгеновских структур 76 комплексов также было показано, нуклеофильная атака $O\gamma$ атома каталитического Ser195 на карбонильный углерод расщепляемой связи идет под прямым углом к плоскости этой связи (на Рисунке 11 соответствующие углы θ_x и θ_y равны $90^\circ \pm 15^\circ$).

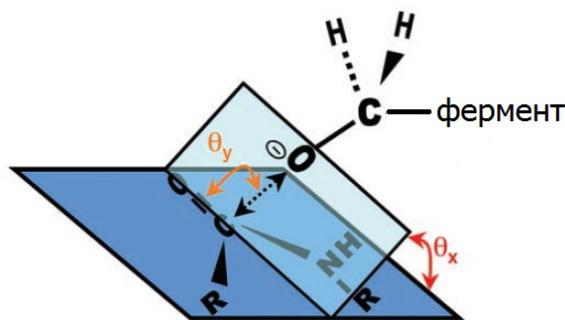


Рисунок 11. Траектория нуклеофильной атаки в комплексе протеаза-ингибитор. θ_x – угол между плоскостью пептидной связи и плоскостью, включающей $O\gamma$ атом Ser195 протеазы, карбонильный углерод и карбонильный кислород ингибитора; θ_y – угол между двумя лучами, проведенными от карбонильного углерода ингибитора: один проведен к $O\gamma$ атому протеазы, другой – к карбонильному кислороду ингибитора. Адаптировано из [135].

1.5.3. Факторы, определяющие конформацию и активность канонических ингибиторов

Протеаза-связывающая петля ингибиторов принимает каноническую конформацию под действием нескольких факторов. В первую очередь, этому способствует сеть водородных связей (а также электростатических и гидрофобных взаимодействий) внутри петли и между петлей и каркасом ингибитора. Так, были установлены во многих канонических ингибиторах нековалентные связи между атомами боковой цепи остатка $P^{1'}$ и атомами боковой и основной полипептидной цепи в остатках P^2 и $P^{3'}$, а также между боковыми цепями остатков P^3 и P^4 , $P^{3'}$ и

P⁴. Также для ингибиторов типична связь между карбонильным кислородом в позиции P² с амидом в позиции P¹. Эти связи возникают, потому что в петле ингибиторов существуют некоторые предпочтения в аминокислотных остатках, занимающих определенные позиции. Как показано на Рисунке 12, в канонических ингибиторах различных семейств чаще остальных встречается Thr в позиции P², гидроксильная группа в боковой цепи которого образует связи с остатком P¹. Также в позиции P³ часто встречается Cys, который как образует внутри-петельные связи, так и формирует дисульфидный мостик, закрепляющий петлю на острове ингибитора. Остатки Met, Arg, Lys и другие в позиции P¹, как правило, не образуют связи с другими остатками петли; они определяют специфичность ингибитора к тому или иному типу сериновых протеаз (трипсин-подобных, химотрипсин-подобных и т.д.). Часто позицию P¹ занимают остатки Glu, Ser и других аминокислот, боковые группы которых устанавливают нековалентные взаимодействия внутри петли и с каркасом. Аналогично, позицию P² часто занимает остаток Tyr [140]. Аминокислотные остатки в петле ингибитора могут не только обеспечивать каноническую конформацию петли, но и образовывать связи с остатками каталитического кармана протеазы. Более того, для некоторых канонических ингибиторов была показана аддитивность влияния аминокислот в петле на энергию связывания с отдельной протеазой [141].



Рисунок 12. Диаграмма встречаемости аминокислотных остатков в позициях петли 12 канонических ингибиторов, выбранных из работы [140], построена с помощью ресурса Web-logo [142]. Ингибиторы: овомукоидный третий домен из серебряного фазана, OMSVP3 (CTMEYR); человеческий панкреатический секреторный ингибитор трипсина, hPSTI (CTYEYR); бычий панкреатический ингибитор трипсина, BPTI (PCKARI); ингибиторы трипсина из тыквы, SMPI-I (CPRILM), и аскариды человеческой, ALTI (CTRECK); экотин (STMMAC); соевые ингибиторы трипсина и химотрипсина, STCI-1 (CTKSNP) и STCI-2 (CALSYP); ингибитор 2 химотрипсина из ячменя, CI-2 (VTMEYR); ингибитор субтилизина из стрептомицетов, SSI (CPMVYD); ингибиторы протеиназ семейства Боумана-Бирка из семян сои Трэйси, PI A-II 1 (CTRSMP) и PI A-II 2 (CTRSQP). В скобках указано однобуквенное обозначение аминокислотных остатков, составляющих участок P³ – P³' петли указанных ингибиторов.

Однако, не все канонические ингибиторы принимают соответствующую конформацию в свободном, не связанном с протеазой виде. Например, ингибитор трипсина из *Enterolobium contortisiliquum*, EcTI, (а также несколько других ингибиторов) в свободной форме принимает конформацию, далекую от канонической, но при связывании с трипсином конформация петли становится строго канонической [143]. Такой же переход петли в каноническую конформацию был показан для эглина-с при связывании с субтилизином [144], а также для ингибитора РМР-С из перелетной саранчи (*Locusta migratoria*) при связывании с химотрипсином [145].

Описанные выше связи в петле ингибитора влияют на связывание с протеазами и на активность ингибитора по отношению к целевой протеазе. На нескольких примерах было показано, что, если в свободной форме канонического ингибитора увеличить количество связей в петле и тем самым повысить жесткость петли, тогда увеличится энергия связывания ингибитора с целевой протеазой (константа ингибирования уменьшится). Обычно изменение числа связей в петле производят, внося аминокислотные замены в ингибитор. И наоборот, если внести такие замены, при которых количество связей в петле понизится, это приведет к увеличению гибкости петли и к уменьшению энергии связывания с протеазами. С термодинамической точки зрения, этот эффект объясняется уменьшением энтропийного компонента в энергии диссоциации комплекса протеаза-ингибитор. Дело в том, что при связывании гибкой, подвижной петли с протеазой жесткость петли увеличивается, а ее подвижность уменьшается, что приводит к уменьшению конформационной энтропии ингибитора и к уменьшению энергии связывания.

Например, при внесении аминокислотных замен в петлю ингибитора трипсина из подсолнечника, SFTI-I, которые приносили дополнительные водородные связи в петлю и стабилизировали ее (в первую очередь, это внесение Asn), активность ингибитора к калликреину-4 была увеличена на 3(!) порядка [146]. При этом слабая активность SFTI-I по отношению к другим протеазам исчезала при внесении аминокислотных замен. В последующей работе этой группы на примере SFTI-I и протеаз семейства калликреинов было показано, что каноническая конформация петли способствует быстрой ассоциации комплекса протеаза-ингибитор, в то время как специфическая аминокислотная последовательность петли, комплементарная последовательности протеазы, и наличие водородных связей внутри петли и между петлями и каталитическим карманом способствуют стандартному механизму ингибирования (задерживают даже расщепленную петлю в кармане протеазы) и определяют медленную диссоциацию комплекса [147]. Однако, остается неясным, насколько применимы выводы этой работы к остальным семействам ингибиторов, ведь SFTI-I имеет ряд отличительных особенностей: этот полипептид является циклическим и имеет очень малый размер – его масса составляет всего около 1,5 кДа.

Противоположный вывод можно сделать на основе работы [148], где было показано, что в химерном белке, у которого петля взята от ингибитора трипсина из *Erythrina caffra*, ETI, а каркас – от ингибитора химотрипсина из *Psophocarpus tetragonolobus*, WCI, петля имела неканоническую конформацию; при этом сам белок потерял ингибирующую активность к трипсину. Химерный белок с неканонической конформацией был хорошим субстратом трипсина. При этом внесение мутаций в каркас химерного белка, которые не затрагивают прямое взаимодействие с трипсином, но увеличивают жесткость петли и придают ей каноническую конформацию, приводило к восстановлению активности против трипсина [149]. Эта группа авторов делает вывод, что ассоциация с протеазой определяется, в первую очередь, последовательностью петли ETI, а ингибирующая активность определяется ее жесткостью. Этот вывод является полностью противоположным выводу первой группы авторов [147] о важности канонической конформации SFTI-I для ассоциации с протеазой.

Еще один пример важности жесткости петли для ингибирующей активности приведен в работе [150], в которой на бычьем панкреатическом ингибиторе трипсина, BPTI (он же апротинин), было показано, что внесение в каркас ингибитора мутации Tyr35Gly, убирающей связь с петлей, приводит к появлению неканонической конформации и гибкости петли и к уменьшению активности против трипсина.

1.5.4. Неканонические механизмы ингибирования сериновых протеаз

Кроме канонического механизма ингибирования сериновых протеаз, известно еще несколько механизмов. Некоторые ингибиторы действуют, стерически блокируя активный центр – при этом происходит так называемое «непродуктивное» связывание, т.е. образование нековалентного комплекса между петлей ингибитора и активным центром протеазы, которые образуют параллельный бета-слой (эта ориентация противоположна ориентации канонического ингибитора). В результате такого связывания ингибитор не взаимодействует с оксианионным центром и не происходит расщепления петли ингибитора [94]. Поскольку одно лишь непродуктивное связывание ингибитора с активным центром приводит к относительно более слабому ингибированию, поэтому такие ингибиторы часто имеют второй сайт связывания с протеазой. Такие ингибиторы встречаются у животных, питающихся кровью: это, например, гирудин (из медицинской пиявки), гемедин, орнитодорин и другие. Они специфически ингибируют некоторые факторы свертывания (в первую очередь, тромбин и фХа), связываясь N-концевой частью ингибитора с активным центром (формируется параллельный бета-слой), а C-концевой частью – с одним из аллостерических сайтов связывания субстрата или гепарина [136].

Оригинальным механизмом, отличающимся от канонического, выделяется широкий класс ингибиторов, называемых серпинами (к этому классу относятся, в частности, упомянутые выше С1-ингибитор и антитромбин). При расщеплении пептидной связи ингибитора в активном центре сериновой протеазы стабилизируется ацил-ферментный комплекс, а не Михаэлисов комплекс, как у канонических ингибиторов. Общими чертами в структуре серпинов являются наличие одного домена в белке, трех бета-листов, 8 – 9 альфа-спиралей и гибкой реактивной петли, состоящая из 10 – 20 остатков [94]. Причем один из бета-листов является незавершенным; недостающим фрагментом этого бета-листа является N-концевая половина реактивной петли, которая в активном ингибиторе простирается свободным петельным фрагментом и не входит в состав бета-слоя. Состояние нерасщепленного ингибитора (с незавершенным бета-слоем) является метастабильным, примерно на 30 ккал/моль энергетически менее выгодным, чем стабильное состояние, в котором участок реактивной петли встроен в бета-лист. Однако в интактном ингибиторе практически не происходит переход в стабильное состояние из-за стерических ограничений на положение реактивной петли. Реактивная петля в изолированном виде является хорошим субстратом для целевой протеазы. Если некоторый серпин ингибирует несколько протеаз, то реактивная петля такого ингибитора может содержать несколько частично перекрывающихся сайтов для этих протеаз. Первоначально при нековалентном связывании с каталитическим карманом реактивная петля также переходит в каноническую конформацию. Далее реакция быстро проходит стадию образования тетраэдрического интермедиата, и продукты стабилизируются в состоянии, когда пептидная связь расщеплена; при этом отщепленный С-концевой участок петли (с остатками в позициях $P^{1'}$ – $P^{2'}$ – ...) становится свободным и диссоциирует от протеазы, а N-концевой участок петли (с остатками ... – P^2 – P^1) остается ковалентно связанным с каталитическим серином протеазы (ацил-ферментный комплекс). При этом N-концевой участок петли встраивается в бета-слой, и ингибитор переходит в энергетически более выгодное состояние. Поскольку этот участок петли остается связанным с каталитическим серином, то переход в стабильное состояние ингибитора сопровождается значительным конформационным изменением в протеазе (относительное перемещение участков протеазы может достигать 70 Å). В новой конформации протеазы ее активный центр нарушается, в результате чего протеаза необратимо теряет активность [151]. С точки зрения ферментативной кинетики, серпины часто действуют на протеазы как каталитический яд.

1.6. Проблема избирательности ингибирования фактора XIIa

В предыдущих разделах было описано, что известно про механизм ингибирования сериновых протеаз. Часть исследований говорит о том, что ингибирование целевой протеазы по

стандартному механизму осуществляется за счет ассоциации аминокислотных остатков протеаза-связывающей петли с остатками каталитического кармана, после чего проходят первые реакции гидролиза связи; однако, эти реакции обращаются за счет того, что жесткость петли в канонической конформации и ее связи с остатками протеазы позволяют ингибитору «задержаться» в кармане протеазы. С другой стороны, подавляющее большинство этих исследований было проведено с использованием в качестве модельных протеаз трипсина и химотрипсина. Каноническое ингибирование сериновых протеаз свертывания (а тем более фактора XIIa, структура которого еще не разрешена) изучено в очень ограниченном количестве работ. Структуры канонических ингибиторов фXIIa, к которым относятся КТИ, СМТИ-III, LCTI-III, а также, предположительно, инфестин-4, были получены только в комплексе с трипсином. С фундаментальной точки зрения, изучение структурных факторов, обеспечивающих каноническое ингибирование фXIIa, позволило бы усовершенствовать представление о стандартном механизме ингибирования. С практической точки зрения, такое представление позволило бы спроектировать и создать новые высокоэффективные ингибиторы фXIIa.

Другой, еще более важной проблемой является вопрос о механизмах, которые обеспечивают селективное ингибирование конкретной протеазы. На примере протеаз свертывания, которые являются гомологичными трипсин-подобными протеазами, эта проблема формулируется следующим образом: какие черты в структуре канонического ингибитора позволили бы ему сильно связываться с фXIIa и при этом не позволили бы ему связываться с другими протеазами свертывания, каталитические карманы которых очень близки по структуре карману фXIIa. Разрешение этого вопроса затрудняется недостатком сведений о селективности известных ингибиторов фXIIa. И, в целом, в отличие от механизмов, обеспечивающих ингибирующую активность, механизмы селективности канонического ингибирования практически не изучены.

Ранее предполагалось, что селективность определяется аминокислотным составом петли за счет ее взаимодействия с каталитическим карманом. Однако, существует лишь небольшое количество работ, в которых при внесении мутаций в петлю увеличивалась селективность ингибитора. Причем в этих работах увеличение селективности обеспечивалось, в первую очередь, за счет увеличения активности к целевой протеазе, а не за счет уменьшения неспецифической активности к другим протеазам. Другим возможным фактором, влияющим на селективность, может быть связывание участков ингибитора, лежащих вне петли, с участками протеазы вне каталитического кармана. Однако, известна только одна работа, в которой был проанализирован этот тип взаимодействий для канонических ингибиторов. Авторы исследования [145] изучили взаимосвязь структуры и функции ингибитора PMP-D2 из перелетной саранчи,

который ингибирует бычий трипсин и трипсин из саранчи, но не ингибирует свиной трипсин. Было предположено, что видовую специфичность этого ингибитора определяет участок $P^{10} - P^6$, находящийся вне протеаза-связывающей петли. Стоит отметить, что в данной работе, как и во многих других, исследование взаимосвязи структура – функция ингибитора проводилось как с помощью экспериментальных методик (рентгеноструктурного анализа и ядерного магнитного резонанса), так и с использованием вычислительных методик (молекулярной динамики и белок-белкового докинга). Особенную важность вычислительные подходы приобретают, когда исследуются протеазы или ингибиторы с неизвестной структурой.

Вывод о том, что некоторые участки ингибитора, находящиеся вне протеаза-связывающей петли и связывающиеся с протеазой вне каталитического кармана, могут определять его специфичность к тому или иному ферменту, можно сделать при рассмотрении другого типа ингибиторов, серпинов. В работе [152] было показано, что значительно большая активность антитромбина против фХа, чем против аПС, вызвана связыванием вне-петельного участка антитромбина с автолитической петлей фХа и отсутствием связывания с автолитической петлей аПС. Получается, что высокая специфичность связывания двух белков достигается, в основном, в тех случаях, когда взаимодействие происходит по двум и более сайтам; такие случаи характерны как для отдельных классов ингибиторов протеаз (серпины, неканонические ингибиторы), так и для других белков, принадлежащих к различным классам и имеющих различные функции, например, для интерлейкина-11 и онкогенного белка S100P [153, 154]. Однако считается, что взаимодействие канонического ингибитора с сериновой протеазой является одно-сайтовым [136]; очевидно, что в таком случае встает проблема специфического связывания между белками.

Разрешение проблемы селективности ингибирования позволило бы создать общую стратегию поиска новых ингибиторов с заранее заданной ингибирующей активностью, в частности, помогло бы создать высокоселективный ингибитор фХIIа. Такой ингибитор, специфически блокирующий контактную активацию в плазме крови, позволит значительно улучшить методики исследования свертывания и убрать нежелательные искажения, вносимые контактной активацией. Высокоселективный ингибитор фХIIа поможет в изучении роли фХII в системе свертывания и в исследовании механизма активации фХII на тромбоцитах с ФС, а также может стать основой для новых антитромботических препаратов. Кстати, методом предотвращения контактной активации, альтернативным прямому ингибированию фХIIа, может стать ингибирование трансглутаминазной активности, которая может приводить к появлению прокоагулянтных тромбоцитов с ФС.

Постановка задачи

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, 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).

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Реактивы и буферные растворы

В работе были использованы следующие реактивы. ДНК-полимеразы Vent и Taq, рестриктазы BamHI, NotI, NdeI, HindIII, NcoI, EcoRI, SapI, XhoI, NheI, BbsI, фрагмент Кленова, щелочная фосфатаза из кишечника теленка, T4 ДНК-лигаза, T4 полинуклеотидкиназа и смесь нуклеозидтрифосфатов (dNTP) были приобретены в New England Biolabs (США). Ампициллин, карбенициллин и канамицин, а также красители бромфеноловый синий и ксиленцианол были приобретены в Amerco (США). Никель-нитрилотриуксусная кислота (Ni-NTA)-конъюгированная агароза была приобретена в Qiagen (США). Жидкая питательная среда Лурия-Бертани (LB) для выращивания клеток состояла из 1 % триптона, 1 % NaCl, 0,5 % дрожжевого экстракта; триптон и дрожжевой экстракт были приобретены в BD Biosciences (США). Твердая агаризованная среда состояла из жидкой среды LB с добавлением 1,5 % агара (BD Biosciences).

Факторы свертывания альфа-фXIIa, фXIa, фIXa, фXa, альфа-тромбин, а также активный протеин С, плазменный калликреин и плазмин, выделенные из человеческой плазмы, были приобретены в Hematologic Technologies (США). Человеческий рекомбинантный фVIIa (NovoSeven) был приобретен в NovoNordisk (Дания). Апираза из картофеля, тканевая трансглутаминаза (тТГ) из печени морской свинки, фибриноген из плазмы человека, человеческий рекомбинантный тканевый активатор пламиногена (Alteplase), цистамин, серотонин и ГТФ были приобретены в Sigma-Aldrich (США). Бычий тромбин и простагландин E1 были приобретены в MP Biomedicals (США). Хромогенные субстраты S-2302, S-2366, S-2765 были приобретены в Chromogenix (Италия). Хромогенные субстраты Spectrozyme FIXa, Spectrozyme FVIIa, Spectrozyme PCa, Spectrozyme tPA были приобретены в American Diagnostica (США). Хромогенный субстрат к тромбину Refachrome TH 5244 с формулой Tos-Gly-Pro-Arg-pNA и конвульксин из яда змеи *Crotalus durissus terrificus* были приобретены в Pentapfarm (Швейцария). Флуорогенный субстрат к тромбину с формулой Z-Gly-Gly-Arg-AMC был приобретен в Bachem (Швейцария). Флуоресцеин изотиоцианат (FITC)-конъюгированное антитело к фибриногену человека было приобретено в Labvision (США). R-фикоэритрин-конъюгированный аннексин V был приобретен в Molecular Probes (США). Фенилметилсульфонилфторид (PMSF) был приобретен в Thermo Fisher Scientific (США). PPACK был приобретен в Calbiochem (США). Ингибитор T101 был приобретен в ZEDIRA (Германия). Все прочие реагенты были не менее чем аналитического уровня чистоты и были приобретены в Sigma-Aldrich.

Олигонуклеотиды были синтезированы в Macrogen (США) и Бигль (Россия). Секвенирование ДНК осуществляли в Macrogen (США) и Евроген (Россия).

Синтетический пептид LCTI-III (RICPRILMECSSSDSCLAECICLENGFCG) с дисульфидными связями Cys 3 – 20, 10 – 22 и 16 – 28, созданными путем окислительного рефолдинга, был синтезирован в Creative Dynamics (США) с чистотой 85 %. КТИ был выделен из зерен кукурузы с помощью аффинной хроматографии (ООО Научно-производственная фирма «Гамма»; Пушкино, Россия). Коллаген-подобный пептид (CRP) любезно предоставлен проф. Р.В. Фарндейлом (Университет Кембриджа, Великобритания).

В работе были использованы следующие буферные растворы:

Буфер ДНК-полимеразы 20 мМ Трис-НСl pH 8,8; 10 мМ (NH₄)₂SO₄; 10 мМ KCl; 2 мМ MgSO₄; 0,1 % Triton X-100.

Буфер рестрикции-3 50 мМ Трис-НСl pH 7,9; 100 мМ NaCl; 10 мМ MgCl₂; 1 мМ дитиотреитол (DTT).

Буфер рестрикции-4 20 мМ Трис-ацетат; 50 мМ ацетат калия; 10 мМ ацетат магния; 1 мМ DTT; pH 7,9.

Буфер лигирования 50 мМ Трис-НСl pH 7,5; 10 мМ MgCl₂; 1 мМ АТФ; 10 мМ DTT.

ТАЕ-буфер 40 мМ Трис; 20 мМ уксусная кислота; 1 мМ этилендиаминтетраацетат (ЭДТА).

Фосфатный буфер 10 мМ Na₂HPO₄; 1,8 мМ KH₂PO₄; 140 мМ NaCl; 2,7 мМ KCl; pH 7,3.

Буфер отщепления Prescission протеазой 50 мМ Трис-НСl pH 7,5; 150 мМ NaCl; 1 мМ ЭДТА; 1 мМ DTT.

Буфер элюции глутатионом 50 мМ Трис-НСl pH 8,0; 10 мМ восстановленный глутатион.

Буфер связывания с хитином 20 мМ Трис-НСl pH 8,0; 500 мМ NaCl; 1 мМ ЭДТА; 0,1 % Твин-20.

Буфер растворения телец включения 50 мМ Трис-НСl; 8 М мочевины; 10 мМ DTT; pH 7,9.

Буфер «кислой» элюции 10 мМ Трис-НСl; 100 мМ NaH₂PO₄; 8 М мочевины; pH 4,5.

Буфер лизиса 40 мМ Трис-НСl pH 8,0; 500 мМ NaCl; 10 мМ имидазол.

Восстанавливающий буфер 500 мМ Трис-НСl pH 8,5; 8 М мочевины; 2 мМ DTT.

Окисляющий буфер 100 мМ Трис-НСl pH 8,4; 200 мМ KCl; 5 мМ восстановленный глутатион; 1 мМ окисленный глутатион.

Буфер отщепления тромбином на колонке 20 мМ Трис-НСl pH 8,0; 150 мМ NaCl; 2,5 мМ CaCl₂.

Буфер нанесения на полиакриламидный гель 50 мМ Трис pH 6,8; 6 % глицерин; 2 % додецилсульфат натрия; 1 % 2-меркаптоэтанол; 0,004 % бромфеноловый синий.

Буфер Лэммли 25 мМ Трис; 0,1 % додецилсульфат натрия; 192 мМ глицин.

Буфер выделения белков 50 мМ Трис pH 7,4; 500 мМ NaCl; 10 мМ имидазол.

Буфер хранения белков 200 мМ HEPES pH 7,4; 150 мМ NaCl.

Буфер удаления ионов никеля 50 мМ ЭДТА-Na pH 8,4.

Буфер для хроматографии 20 мМ Трис-HCl pH 8,0.

Буфер расщепления тромбином 20 мМ Трис-HCl pH 8,4; 150 мМ NaCl; 2,5 мМ CaCl₂.

Буфер хромогенного теста 50 мМ Трис-HCl pH 7,4, 130 мМ NaCl, 0,5 % бычий сывороточный альбумин.

Буфер для субстрата тромбина 18 мМ Hepes pH 7,5, 130 мМ NaCl, 10 % диметилсульфоксид (DMSO).

Буфер растворения ингибиторов 30 мМ Hepes pH 7,4.

Буфер теста генерации тромбина 20 мМ Hepes pH 7,5, 145 мМ NaCl.

Тромбоцитарный буфер 20 мМ Hepes, 150 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 0,4 мМ NaH₂PO₄, 5 мМ глюкоза, 0,5 % бычий сывороточный альбумин, pH 7,4.

Диализный буфер 50 мМ NH₄HCO₃; 0,1 % полиэтиленгликоль-8000; pH 7,8.

Штаммы *Escherichia coli* (*E. coli*) были приобретены в EMD Millipore (Германия):

E. coli NovaBlue Singles был использован для клонирования векторов и наработки плазмид. Генотип NovaBlue Singles: *endA1 hsdR17* (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'* [*proA*⁺*B*⁺ *lacI*^q*ZΔM15::Tn10*] (TetR). Данный штамм, устойчивый к тетрациклину, не содержит ген *recA* и позволяет сохранять плазмиду в клетке и получать высокую эффективность трансформации.

E. coli BL21 (DE3) был использован для экспрессии рекомбинантных белков. Генотип BL21 (DE3): F⁻ *ompT gal dcm lon hsdS_B* (г_В⁻ т_В⁻) λ (DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*]). Данный штамм является лизогеном бактериофага λDE3, несущего ген *lac* оперона *lacI*, *lacUV5* промотор и ген T7 РНК-полимеразы; кроме того, данный штамм является мутантом по протеазам *ompT* и *lon*, что позволяет получать высокий выход целевого белка, экспрессия которого индуцируется изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом (ИПТГ).

2.2. Гетерологическая экспрессия ингибиторов фактора XIIa

2.2.1. Клонирование гена тыквенного ингибитора СМТИ-III и создание различных систем экспрессии

Генетическая конструкция для экспрессии слитого белка СМТИ-III и глутатион-S-трансферазы (GST) была создана следующим образом: синтетический ген СМТИ-III клонировали по сайтам рестрикции ферментов BamHI и NotI в экспрессионную плазмиду pGEX-4T-1 (GE Healthcare; Великобритания), которая кодирует устойчивость к ампициллину и содержит ген GST из *Schistosoma japonicum* под *Ptac*-промотором, регулируемым *lac*-опероном. Олигонуклеотид

СМТІ (Таблица 5) длиной 140 нуклеотидов содержит на концах сайты рестрикции указанных ферментов; на 5'-конце после сайта BamHI содержится последовательность, кодирующая сайт узнавания LEVLFQ*GP (*отмечена расщепляемая связь) для Precission протеазы (GE Healthcare); далее следует последовательность гена СМТІ-III с кодонами, оптимизированными для *E. coli*, которая завершается стоп-кодом TGA. Общая длина кодируемого полипептида – 263 а.о. Фрагмент ДНК 140 п.н. был наработан до массы порядка 3 мкг при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad; США) с использованием 40 ед./мл Vent ДНК-полимеразы, которая достраивала олигонуклеотиды 1For и 1Rev (по 2 мкМ), комплементарно связавшиеся с олигонуклеотидом СМТІ (0,2 мкМ). ПЦР проводилась в присутствии 250 мкМ нуклеозидтрифосфатов (dNTP), из которых синтезируется цепь ДНК, в буфере ДНК-полимеразы (20 мМ Tris-HCl pH 8,8; 10 мМ (NH₄)₂SO₄; 10 мМ KCl; 2 мМ MgSO₄; 0,1 % Triton X-100), при следующих температурных режимах: 30 циклов по (95 °С – 50 сек, 56 °С – 50 сек, 72 °С – 25 сек). Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1,5 % агарозном геле; целевой продукт 140 п.н. очищали из геля. После этого фрагмент ДНК-вставки подвергали рестрикции 100 ед./мл BamHI и NotI в течение 1 часа при 37 °С в буфере для рестрикции-3 (50 мМ Tris-HCl pH 7,9; 100 мМ NaCl; 10 мМ MgCl₂; 1 мМ дитиотреитола (DTT)). При таких же условиях рестрикции подвергали вектор – плазмиду pGEX-4T-1. После анализа электрофорезом и очистки из геля продуктов рестрикции их концы дефосфорилировали с помощью 100 ед./мл телячьей кишечной щелочной фосфатазы, чтобы предотвратить их самолигирование.

Таблица 5. Олигонуклеотиды для клонирования гена СМТІ-III в вектор pGEX-4T-1

Олигонуклеотид	5' – 3' последовательность
СМТІ	<u>agtcggatccctggaagttctgttccaggggccccgtgatgtccgcgtatcttgatgaaatgcaagaaag</u> <u>acagcgattgcctggcagaatgcgtgtgcttagaacatggctattgtggttgagcggccgcaaggttcc</u>
1For	<u>agtcggatccctggaagttctg</u>
1Rev	<u>ggaaccttgccggccgctcaacc</u>
prGEXd	ggctggcaagccacgtttggtg
prGEXrnew	cgggagctgcatgtgtcagagg

Сайты рестрикции обозначены *курсивом*; перекрывающиеся комплементарные участки подчеркнуты.

После очистки вектора и вставки их лигировали T4 ДНК-лигазой (1 ед./мкл) при 4 °С в течение 16 часов или при 37 °С в течение 1 часа в буфере для лигирования (50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 10 мМ MgCl₂; 1 мМ АТФ; 10 мМ DTT). После лигирования реакцию смесь трансформировали по методу теплового шока (42 °С – 40 сек, 0 °С – 2 мин, добавить среду и при 37 °С – 45 мин) в компетентные клетки *E. coli* NovaBlue Singles, которые высевали на

агаризованную среду LB с 50 мкг/мл карбенициллина и выращивали при 37 °С, получая на следующий день порядка 10 – 100 одиночных колоний. Чтобы выбрать клоны, которые содержат плазмиду pGEX-CMTI, был проведен ПЦР-скрининг 11 колоний, надосадов от которых после кипячения выступал в роли ДНК-матрицы для ПЦР с использованием 50 ед./мл Taq ДНК-полимеразы и 250 мкМ dNTP в буфере ДНК-полимеразы, которая проводилась за 20 циклов по (95 °С – 50 сек, 56 °С – 50 сек, 72 °С – 25 сек). В качестве праймеров использовались либо prGEXd и prGEXnew, либо 1For и 1Rev (по 2 мкМ каждого праймера) (Таблица 5). Для первой пары праймеров вектор без вставки дает продукт размером 171 п.н., а вектор со вставкой – на 90 п.н. больше. Для второй пары праймеров вектор со вставкой дает продукт размером 140 п.н. Далее с помощью секвенирования с праймера prGEXd было проанализировано, какие клоны содержат правильную вставку гена CMTI-III в вектор pGEX-4T-1. Из таких клонов выделяли плазмиду и трансформировали ее в штамм *E. coli* BL21 (DE3), из которого получали штамм-продуцент *E. coli* BL21 (DE3)/pGEX-CMTI.

Штамм-продуцент *E. coli* BL21 (DE3)/pGEX-CMTI нарабатывали при 37 °С в жидкой среде LB с 100 мкг/мл ампициллина в объеме 0,5 л до оптической плотности культуры при 600 нм, равной примерно 0,5, после чего индуцировали экспрессию целевого белка 1 мМ ИПТГ. Далее получали клеточный осадок, из которого выделяли наработанный белок с помощью ультразвукового диспергатора. Центрифугированием разделяли клеточный лизат на растворимую и нерастворимую фракции; растворимую фракцию наносили на колонку, заполненную глутатион-сефарозой 4В (GE Healthcare) в фосфатном буфере (10 мМ Na₂HPO₄; 1,8 мМ KH₂PO₄; 140 мМ NaCl; 2,7 мМ KCl; pH 7,3). После инкубации сорбентом в течение 30 мин при комнатной температуре с колонки собирали проскок из не связавшихся белков. Сорбент отмывали 3 порциями по 15 мл фосфатного буфера, отбирали пробу сорбента со связанным белком GST-CMTI-III и производили смену буфера на буфер для отщепления Prescission протеазой (50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 150 мМ NaCl; 1 мМ ЭДТА; 1 мМ DTT). Prescission протеаза является слитой с GST и остается связанной с сорбентом в ходе протеолиза. Собирали три порции раствора с отщепленным CMTI-III, отбирали пробу сорбента с оставшимся на нем GST, который далее элюировали буфером для элюции глутатионом (50 мМ Tris-HCl pH 8,0; 10 мМ восстановленного глутатиона). Добавленный в буфер глутатион конкурирует за связывание с GST с иммобилизованным глутатионом, что приводит к вытеснению рекомбинантного белка в раствор. Процесс очистки и расщепления протеазой рекомбинантного белка на колонке анализировали белковым электрофорезом.

Генетическая конструкция для экспрессии слитого белка CMTI-III с интеином (самосплайсирующим белковым элементом) и хитин-связывающим доменом (CBD) была

создана следующим образом. ПЦР проводилась по описанному выше протоколу с праймерами Nde_for и Sap_rev Ala30 (Таблица 6), которые содержат комплементарные к олигонуклеотиду СМТИ участки и сайты рестрикции ферментов NdeI и SapI. Праймер Sap_rev Ala30 также содержит кодон для дополнительной аминокислоты Ala на С-конце белка СМТИ-III, которая нужна для эффективного самосплайсинга интеинового элемента.

Таблица 6. Олигонуклеотиды для клонирования гена СМТИ-III в вектор pTYB1

Олигонуклеотид	5' – 3' последовательность
Nde_for	atgccgtacatatgcgtgtatgtccgcgtatcttg
Sap_rev Ala30	agtctgatgctcttccgcaggcaccacaatagccatgttctaag
Bgl2pTYB_rev	аасссаасагааагаатсгтсг

Сайты рестрикции обозначены *курсивом*; перекрывающиеся комплементарные участки подчеркнуты.

Продукт реакции длиной 124 п.н. (Рисунок 13А) клонировали в плазмиду pTYB1 (New England Biolabs), которая кодирует устойчивость к ампициллину и содержит гены интеина и CBD под T7-промотором, регулируемым *lac*-опероном. Для этого вставку и вектор подвергали рестрикции NdeI и SapI в течение 1 часа при 37 °С в буфере для рестрикции-4 (20 мМ Tris-ацетата; 50 мМ ацетата калия; 10 мМ ацетата магния; 1 мМ DTT; pH 7,9). Для контроля активности рестриктаз к плазмиде также добавляли по одной рестриктазе или не добавляли вовсе. Как видно на Рисунке 13Б, активность SapI была очень малой и практически не приводила к разрезанию плазмиды в линейную форму. Поэтому для успешного проведения клонирования был взят 10-кратный избыток этого фермента. После анализа и очистки продуктов рестрикции и их дефосфорилирования проводили реакцию лигирования, после чего трансформировали плазмиды в *E. coli* NovaBlue Singles, высеваемые на среду с 50 мкг/мл карбенициллина. После ПЦР-скрининга полученных колоний правильность вставки была подтверждена секвенированием с обратного праймера Bgl2pTYB_rev, и выделенные плазмиды трансформировали в *E. coli* BL21 (DE3) для получения штамма-продуцента. Общая длина полипептида, нарабатываемая продуцентом *E. coli* BL21 (DE3)/pTYB-СМТИ, составляет 548 а.о. (Рисунок 14 А). Изначально штамм высевали в жидкую среду LB с 100 мкг/мл ампициллина и наращивали культуру при 37 °С, пока оптическая плотность культуры при 600 нм не достигнет 0,5 – 0,6; после индукции 0,4 мМ ИПТГ экспрессия целевого белка длилась в течение 6 часов при 37 °С. Индукция экспрессии с плазмиды pTYB-СМТИ рекомбинантного белка СМТИ-III, слитого с интеином и CBD, а также индукция экспрессии с контрольной плазмиды pTYB1 полипептида, состоящего только из интеина и CBD, приводило к замедлению роста культуры и к переходу из экспоненциальной фазы роста в линейную фазу (Рисунок 14Б).

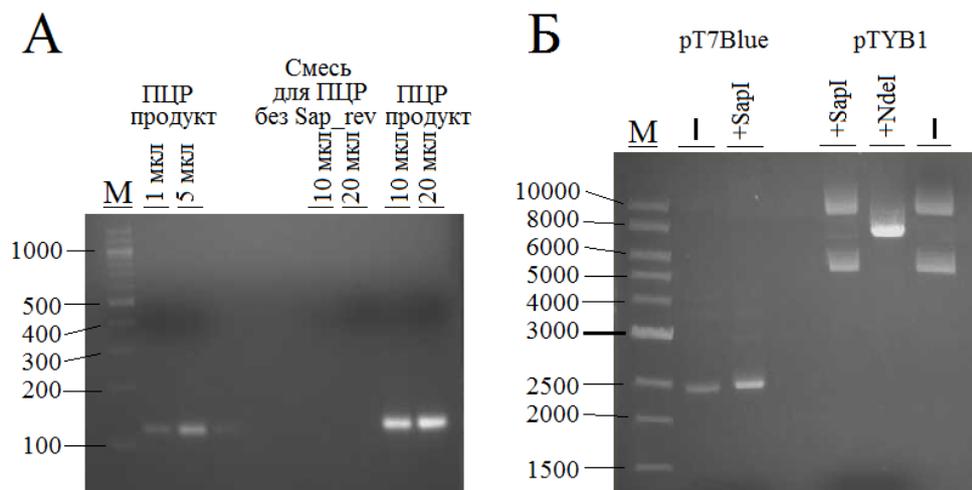


Рисунок 13. Клонирование гена СМТИ-III в плазмиду рТҮВ1. (А): Нароботка гена СМТИ-III с праймерами Nde_for и Sap_rev Ala30. В лунки 1,5 % агарозного геля нанесены 1 мкл, 5 мкл, 10 мкл и 20 мкл ПЦР-смеси; в качестве отрицательного контроля нанесены 10 и 20 мкл смеси без праймера Sap_rev Ala30. (Б): Анализ в 0,5 % геле продуктов рестрикции рТ7Blue (2887 п.н.) и рТҮВ1 (7477 п.н.) ферментами SapI и NdeI. Отрицательный контроль («←») не содержал рестриктазы. Предполагается, что рТ7Blue без рестрикции имеет суперскрученную форму, поэтому мигрирует как фрагмент длиной около 2,5 тыс. п.н., а рТҮВ1 имеет как суперскрученную форму (мигрирует как 5,5 тыс. п.н.), так и кольцевую форму (мигрирует как 10 тыс. п.н.). При добавлении активных рестриктаз (NdeI) она приобретает линейную форму (7,5 тыс. п.н.). М – маркер длины фрагментов ДНК (длины показаны в п.н.).

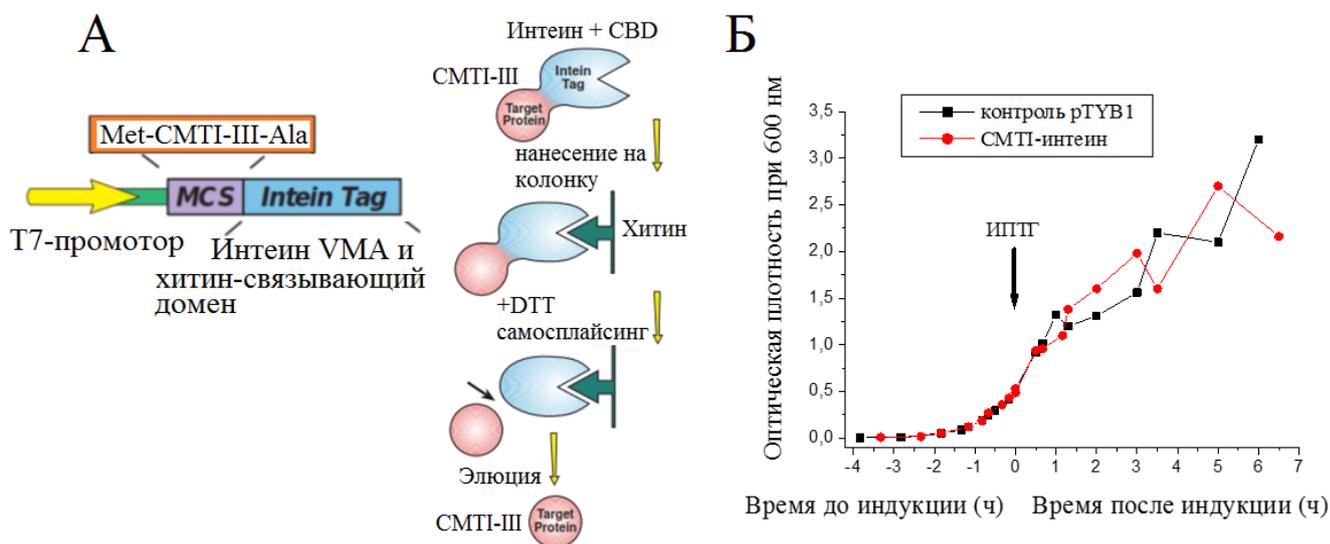


Рисунок 14. (А): Схема белок-кодирующей последовательности плазмиды рТҮВ-СМТИ и схема очистки рекомбинантного белка. После клонирования гена с дополнительными кодонами Met и Ala в множественный центр клонирования (MCS) плазмиды рТҮВ1, в клетках нарабатывается слитый белок с интеином VMA и хитин-связывающим доменом, очищаемый нанесением на колонку с хитином. Самосплайсинг интеина при добавлении 1 мМ DTT при 4 °С приводит к отщеплению и элюции СМТИ-III. (Б): Рост клеточной культуры штаммов-продуцентов *E. coli* BL21 (DE3)/рТҮВ-СМТИ («СМТИ-интеин», красные точки) и *E. coli* BL21 (DE3)/рТҮВ1 (черные точки) при 37 °С. Стрелкой отмечен момент индукции добавлением 0,4 мМ ИПТГ.

Растворимую фракцию клеточного лизата наносили на колонку, заполненную сорбентом с иммобилизованным хитином (New England Biolabs) в буфере для связывания с хитином (20 мМ Tris-HCl pH 8,0; 500 мМ NaCl; 1 мМ ЭДТА; 0,1 % Твин-20). После инкубации с сорбентом и сбора фракции проскока колонку отмывали, после чего связанный с ней целевой белок, имеющий высокую степень чистоты, расщепляли, индуцируя самосплайсинг интеинового элемента 1 мМ DTT или 100 мМ 2-меркаптоэтанола. Собирали элюат с СМТИ-III, который, предположительно, находился в восстановленной форме. Процесс очистки и расщепления рекомбинантного белка на колонке анализировали белковым электрофорезом.

Генетическая конструкция для экспрессии тандемного белка, содержащего некоторое количество повторяющихся последовательностей СМТИ-III (Рисунок 15А), была создана следующим образом. Олигонуклеотиды СМТИ3М8L_for и СМТИ3М8L_rev_shift, кодирующие последовательность СМТИ-III с внесенной мутацией Met8Leu и имеющие комплементарные друг другу участки длиной 81 нуклеотид и свободные «липкие» концы длиной 9 нуклеотидов (Таблица 7), смешивались (по 5 мкг) в буфере для лигирования. Сначала в течение 45 мин при 37 °С 5'-концы этих олигонуклеотидов фосфорилировались 500 ед./мл Т4 полинуклеотидкиназы, которая далее инактивировалась нагреванием до 95 °С в течение 5 мин. После этого фосфорилированные олигонуклеотиды отжигались друг на друга при 65 °С в течение 20 мин, образуя 1-меры гена СМТИ-III Met8Leu. Добавление Т4 ДНК-лигазы при 37 °С в течение 1 часа приводило к сшиванию 1-меров друг с другом через «липкие» концы и к образованию мультимеров гена. Эти мультимеры очищали и добавляли к ним 100 ед./мл фрагмента Кленова, который достраивал вторую цепь на оставшихся «липких» концах. Продукты сшивания 1-меров анализировали электрофорезом; были очищены фрагменты ДНК из двух различных позиций геля: одна позиция приблизительно соответствовала коротким мультимерам, а вторая позиция – более длинным. Очищенные фрагменты далее лигировали с вектором pT7Blue (EMD Millipore) по тупым концам и трансформировали в *E. coli* NovaBlue Singles, которые высевали на агаризованную среду с 50 мкг/мл карбенициллина; в результате были получены 44 клона. Эффективность трансформации контрольной плазмидой по использованному методу теплового шока составляла $2,5 \times 10^8$ колоний на 1 мкг плазмиды. Далее был проведен ПЦР-скрининг этих клонов с праймерами T7 и U19; продукт ПЦР в случае 1-мерной вставки в плазмиду имел длину 240 п.н. (1 клон), 2-мер – 330 п.н. (4 клона), 3-мер – 420 п.н. (8 клонов), 4-мер – 510 п.н. (13 клонов), 5-мер – 600 п.н. (13 клонов), 6-мер – 690 п.н. (2 клона). Из полученных клонов вырастили культуры, из которых были выделены плазмиды; правильность вставки в плазмидах была подтверждена секвенированием с праймера M13F-pUC. Для ПЦР с праймерами T7 и U19 были выбраны клоны 2-мер_pT7B_8, 3-мер_pT7B_14, 4-мер_pT7B_16, 5-мер_pT7B_23 и 6-

мер_pT7B_2 (Рисунок 15Б). Продукты ПЦР после очистки клонировали в рЕТ28а; 3-мер и 4-мер были лигированы по сайтам рестрикции ферментов BamHI и HindIII, которые отщепляли фрагменты длиной 65 и 25 нуклеотидов, соответственно, а 2-мер, 5-мер и 6-мер – по сайтам NdeI и BamHI, которые отщепляли по 60 – 70 нуклеотидов с концов ПЦР-продукта. Эффективность рестрикции каждым из ферментов анализировалась электрофорезом в агарозе для всех вставок и для вектора. Перед лигированием фрагментов ДНК были дефосфорилированы и очищены; лигирование проходило 16 часов при 4 °С. После трансформации смеси лигирования с рЕТ28а фрагментов ДНК с 2, 3, 4, 5 и 6 tandemными повторами гена СМТИ-III, количество выросших колоний составило 6, 30, 73, 60 и 3, соответственно. Правильность вставки в рЕТ28а была подтверждена секвенированием с обратного праймера Т7 терминатора, а выделенные плазмиды трансформировали в *E. coli* BL21 (DE3) для получения штамма-производителя.

Таблица 7. Олигонуклеотиды для клонирования tandemного гена СМТИ-III в вектор рЕТ28а

Олигонуклеотид	5' – 3' последовательность
СМТИ3М8L_for	<u>cgtgtttgcccgcgatcctgctgaaatgcaagaaagacagcgactgcctggctgaatgcgtttgcc</u> <u>tggaacacggttactgcgggatg</u>
СМТИ3М8L_rev_shift	<u>gcaaacacgcataccgcagtaaccgtgtccaggcaaacgcattcagccaggcagtcgctgtcttt</u> <u>cttgcaatttcagcaggatacgcggg</u>
M13F-pUC	gttttccagtcacgac
Т7 праймер	taatacgaactcactataggg
U19 праймер	gttttccagtcacgacgt
Т7-терминатор праймер	gctagttattgctcagcgg

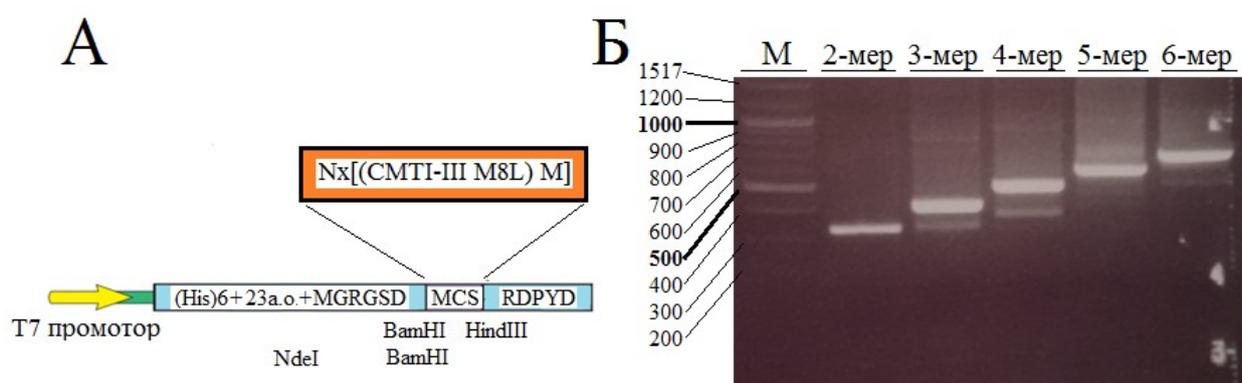


Рисунок 15. Клонирование tandemного гена N повторов белка СМТИ-III Met8Leu в плазмиду рЕТ28а. (А): Схема белок-кодирующей последовательности, включающей Т7 промотор и другие регуляторные последовательности, последовательность гис-тага, сайты рестрикции и tandemные повторы N генов, кодирующих СМТИ-III Met8Leu с добавленной аминокислотой Met30, позволяющей расщеплять мультимеры цианоген бромидом. (Б): Анализ в 1,5 % геле продуктов ПЦР с праймерами Т7 и U19, проведенной на клонах 2-мер_pT7B_8, 3-мер_pT7B_14, 4-мер_pT7B_16, 5-мер_pT7B_23 и 6-мер_pT7B_2.

Штаммы-продуценты, содержащие плазмиду pET28a и 3-, 4- или 5-мерный белок СМТИ-III(Met8Leu)-Met, высевали в жидкую среду LB с 50 мкг/мл канамицина и наращивали культуру при 37 °С, после чего индуцировали 0,4 мМ ИПТГ экспрессию целевого белка в течение 24 часов при 18 °С. Если индукция происходила при 37 °С, то в течение 4 часов целевые белки не нарабатывались. Нерастворимую фракцию клеточного лизата растворяли при помощи буфера для растворения телец включения (50 мМ Tris-HCl; 8 М мочевины; 10 мМ DTT; pH 7,9) и наносили на никель-хелатную колонку (Qiagen), элюция очищенного белка с которой осуществлялась в буфере для «кислой» элюции (10 мМ Tris-HCl; 100 мМ NaH₂PO₄; 8 М мочевины; pH 4,5). Очищенный на колонке белок концентрировали в 10 раз перед расщеплением: сначала осаждали с помощью трихлоруксусной кислоты, потом разводили в 70 % трифторуксусной кислоте, содержащей 150 мМ цианоген бромида (CNBr), 0,1 М HCl и 1 % 2-меркаптоэтанола. Реакцию расщепления проводили при комнатной температуре.

Фрагмент ДНК, кодирующий полигистидиновый таг, В1 домен протеина G из *Streptococcus sp.* (GB1), линкер с сайтом расщепления тромбином и СМТИ-III был создан из двух пар олигонуклеотидов: FuСМТИ1_{up} и FuСМТИ2_{low}, FuСМТИ3_{up} и FuСМТИ4_{low}, имеющих комплементарные друг другу участки длиной 20 нуклеотидов (Таблица 8). Каждую пару олигонуклеотидов отжигали друг на друга и достраивали комплементарные цепи в ходе ПЦР с 6 циклами по (95 °С – 30 сек, 50 °С – 30 сек, 72 °С – 30 сек). Продукты реакции, FuСМТИ1-2 (180 п.н.) и FuСМТИ3-4 (175 п.н.), отжигали друг на друга (FuСМТИ2_{low} и FuСМТИ3_{up} имеют взаимно комплементарный участок длиной 20 нуклеотидов на 5'-конце) и достраивали комплементарные цепи при таких же режимах. Конечный ПЦР-продукт (335 п.н.) клонировали в вектор pET28a (EMD Millipore) по сайтам NcoI и EcoRI, которые находятся на 5'-концах олигонуклеотидов FuСМТИ1_{up} и FuСМТИ4_{low}, соответственно. Полученную плазмиду p28FuСМТИ трансформировали в *E. coli* NovaBlue Singles, секвенированием подтверждали правильность вставки и трансформировали в экспрессионный штамм *E. coli* BL21 (DE3), который высевали в среду LB с 25 мкг/мл канамицина. Последовательность, кодирующая данный белок His-GB1-СМТИ, была депонирована в открытой базе последовательностей GenBank под номером KJ183183.

Таблица 8. Олигонуклеотиды для клонирования генов слитых белков СМТИ-III с GB1 и полигистидиновым тагом в плазмиду pET28a

Олигонуклеотид	5' – 3' последовательность
FuСМТИ1up	<i>cgtccatggtacatcatcatcaccatcacacttacaaactgacctaacggtaaaactctgaaaggcgttctgac</i> <i>ctatcgaagctggtgatgctgctac</i>
FuСМТИ2low	<i>aggttttagtagcatcgtcgttaagtcattcaccgtcaacaccaggctgtagcgtactgttgaacacttttct</i> <i>gcagtagcagcatcaacagcttc</i>
FuСМТИ3up	<i>cgacgatgctactaaaacctcactgttactgaaaactacgacatcccagaccttctggctggtccgcgtgg</i> <i>ttctcgtgtttgcccgctatcctg</i>
FuСМТИ4low	<i>cggaattcaaccgcagtaaccgtgtccaggcaaacgcattcagccaggcagtcagagtctttttgcattca</i> <i>tcaggatacgcgggcaaacacg</i>
forGB1	<i>ggcctccatggtaacttacaaactgacctaac</i>
GB1rev	<i>ggcctgctcttcgagaaccacgcggaaccagacc</i>
4.2.gene-His	<i>cggaattcaatgatggtggtgatggtgaccgcagtaaccgtgtccag</i>
3.2.His-gene	<i>ggcctgctcttcctctcatcaccatcatcaccaccgtgtttgcccgctatcctg</i>
FuСМТИrev	<i>cggaattcaaccgcagtaaccgtg</i>

Сайты рестрикции показаны *курсивом*; перекрывающиеся комплементарные участки подчеркнуты.

Также были созданы различные варианты слитого белка СМТИ-III с GB1 и полигистидиновым тагом. Для получения фрагмента ДНК «Sap-His-СМТИ-Eco», кодирующего последовательно His-таг и СМТИ-III и содержащего сайты рестрикции SapI и EcoRI на 5'- и 3'-концах, соответственно, проводили ПЦР с плазмиды p28FuСМТИ с праймерами 3.2.His-gene и FuСМТИrev. Температура отжига составляла 57 °С в течение 25 циклов; ПЦР-продукт имел длину около 130 п.н. Для получения фрагмента ДНК «Sap-His-СМТИ-His-Eco», кодирующего последовательно His-таг, СМТИ-III и His-таг и содержащего сайты рестрикции SapI и EcoRI на 5'- и 3'-концах, соответственно, проводили ПЦР с плазмиды p28FuСМТИ с праймерами 3.2.His-gene и 4.2.gene-His. Температура отжига составляла 45 °С первые 3 цикла и 65 °С следующие 25 циклов; ПЦР-продукт имел длину около 150 п.н. После обработки рестриктазой SapI оба фрагмента ДНК лигировали с обработанным продуктом ПЦР (3 цикла – 45 °С, 25 циклов – 65 °С) «Nco-GB1-Sap», проведенной с плазмиды p28FuСМТИ с праймерами forGB1 и GB1rev; такой продукт (250 п.н.) кодирует GB1 и сайт тромбина и содержит сайты рестрикции NcoI и SapI на 5'- и 3'-концах, соответственно. Причем, чтобы наработать продукт лигирования двух пар фрагментов: «Nco-GB1-Sap» и «Sap-His-СМТИ-Eco» или «Nco-GB1-Sap» и «Sap-His-СМТИ-His-Eco», были проведены ПЦР с парами праймеров: forGB1 и FuСМТИrev или forGB1 и 4.2.gene-His, соответственно (Рисунок 16А). После этого фрагменты «Nco-GB1-His-СМТИ-Eco» и «Nco-GB1-His-СМТИ-His-Eco» очищали и обрабатывали рестриктазами NcoI и EcoRI. Аналогичным

образом был получен фрагмент ДНК «Nco-GB1-СМТИ-His-Eco» (340 п.н.), кодирующий последовательно GB1, сайт тромбина, СМТИ-III и His-таг и содержащего сайты рестрикции NcoI и EcoRI на 5'- и 3'-концах, соответственно, проводили ПЦР (3 цикла – 45 °С, 25 циклов – 65 °С) с плазмиды p28FuСМТИ с праймерами forGB1 и 4.2.gene-His. Этот фрагмент тоже обрабатывали рестриктазами NcoI и EcoRI.

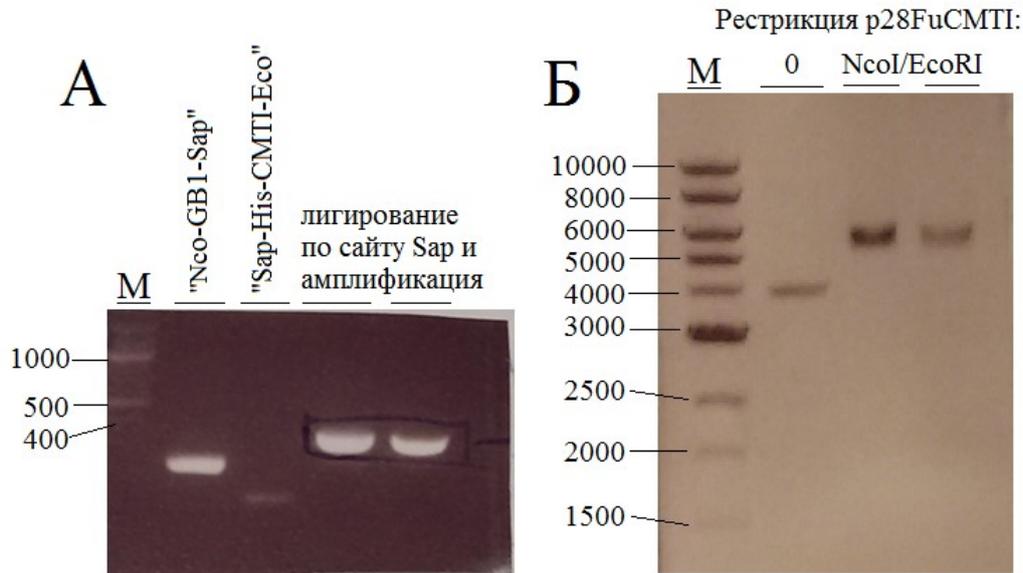


Рисунок 16. Клонирование вариантов слитого белка СМТИ-III с GB1 и His-тагом в вектор pET28 по сайтам NcoI и EcoRI. (А): Электрофорез в 1,5 % агарозном геле фрагментов ДНК «Nco-GB1-Sap» и «Sap-His-СМТИ-Eco», обработанных рестриктазой SapI, а также продукт лигирования этих фрагментов, который был амплифицирован в ПЦР с праймерами forGB1 и FuСМТИrev. (Б): Анализ в 0,5 % агарозном геле плазмиды p28FuСМТИ, обработанной рестриктазами NcoI и EcoRI (5264 п.н.). Для сравнения с линейаризованным продуктом также приведена выделенная из клеток и необработанная плазида, находящаяся в суперскрученной форме. М – маркер длины фрагментов ДНК (длины показаны в п.н.).

Далее все три фрагмента лигировали с плазмидой p28FuСМТИ, обработанной этими рестриктазами (5264 п.н.) (Рисунок 16Б). После лигирования (16 часов при 4 °С) и трансформации в клетки было получено: 1 клон с плазмидой pET-GB1-His-СМТИ, 4 клон с плазмидой pET-GB1-СМТИ-His, 5 клонов с плазмидой pET-GB1-His-СМТИ-His. Наличие вставки проверено ПЦР с праймерами к T7 промотору и терминатору (при наличии вставки продукты 530 – 550 п.н., 314 п.н. – при отсутствии), а также с праймерами forGB1 и к T7 терминатору (продукты 450 – 470 п.н. при наличии вставки). После секвенирования плазмиды трансформировали в экспрессионный штамм. Дополнительно, фрагменты ДНК были клонированы в плазмиду pET19b по сайтам NcoI и XhoI и трансформированы в штамм Origami.

Экспрессию His-GB1-СМТИ (107 а.о.) индуцировали 0,2 мМ ИПТГ при 18 °С в течение 20 часов, после чего осажденные клетки ресуспендировали в буфере для лизиса (40 мМ Tris-HCl pH

8,0; 500 мМ NaCl; 10 мМ имидазола) и разрушали ультразвуком. Растворимую фракцию лизата наносили на колонку с сорбентом, на котором иммобилизованы ионы никеля – His-Select Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich). Очищенный белок элюировали буфером для лизиса, который дополнительно содержал 200 мМ имидазола. Перед элюцией также проводили процедуру рефолдинга и отщепления СМТИ-III тромбином. Восстановление цистеинов в белке и разрушение дисульфидных мостиков проводили в восстанавливающем буфере (500 мМ Tris-HCl pH 8,5; 8 М мочевины; 2 мМ DTT) в течение 1 часа при комнатной температуре, после чего производили обратное образование дисульфидов в окисляющем буфере (100 мМ Tris-HCl pH 8,4; 200 мМ KCl; 5 мМ восстановленного глутатиона; 1 мМ окисленного глутатиона) при комнатной температуре в течение 16 часов. После этого раствор в колонке меняли на буфер для отщепления тромбином на колонке (20 мМ Tris-HCl pH 8,0; 150 мМ NaCl; 2,5 мМ CaCl₂) и добавляли бычий тромбин в расчете 2,5 ед. на 1 мг рекомбинантного белка. Реакцию отщепления проводили в течение 16 часов при 4 °С. После этого собирали отщепленный СМТИ-III, который очищали от содержащегося тромбина на колонке с иммобилизованным гепарином HiTrap Heparin HP (GE Healthcare). Другие варианты слитого белка, GB1-His-СМТИ, GB1-СМТИ-His и GB1-His-СМТИ-His, экспрессировали и очищали при таких же условиях. В отличие от предыдущего варианта, после очистки на никель-хелатной колонке не проводили рефолдинг; после расщепления тромбином СМТИ-III оставался на колонке, а тромбин и GB1 вымывались.

2.2.2. Клонирование последовательностей и экспрессия вариантов инфестина-4

Клонирование гена дикого типа инфестина-4 в экспрессионную плазмиду было проведено в сотрудничестве с Иваном Ивановичем Воробьевым, к.х.н., зав.лаб. ФГБУН Центра «Биоинженерия» Российской академии наук. Ген инфестина-4, кодирующий 56 а.о., был синтезирован путем ПЦР-удлинения пяти частично комплементарных олигонуклеотидов: например, AS-KAZ-1F и AS-KAZ-2R, чьи последовательности приведены в Таблице 9, имеют общий участок комплементарности на 3'-концах длиной 16 нуклеотидов; AS-KAZ-3F и AS-KAZ-4R – длиной 18 нуклеотидов. Эти олигонуклеотиды отжигались друг с другом (т.е. связывались комплементарными участками), после чего комплементарные цепи достраивались ДНК-полимеразой, которая в итоге синтезировала два фрагмента ДНК длиной 105 п.н. и 115 п.н., соответственно. Из-за того, что AS-KAZ-2R и AS-KAZ-3F также имеют общий участок комплементарности на 5'-концах длиной 17 нуклеотидов, то эти два продукта длиной 105 и 115 п.н. отжигались друг с другом при смешивании и тоже достраивались ДНК-полимеразой. Продукт этой реакции аналогичным образом достраивался при связывании AS-KAZ-5R, что приводило к образованию конечного продукта – фрагмента ДНК длиной 214 п.н. Ген инфестина-

4 клонировали сначала в плазмиду p10E по сайтам рестрикции NheI и HindIII, после чего этот ген суб-клонировали по сайтам NcoI и HindIII в плазмиду pET32a (EMD Millipore), которая кодирует тиоредоксин I (Trx), полигистидиновый таг и сайт расщепления тромбином. Полученную плазмиду pET32-Inf4 трансформировали в компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3) методом теплового шока, после чего отбирали клоны, которые выращивали в среде LB с 0,1 мг/мл ампициллина и 0,1 % глюкозы. Среди полученных клонов был выбран штамм-продуцент *E. coli* BL21 (DE3)/pET32a-Inf4 для экспрессии рекомбинантного Trx-Inf4, который содержит последовательно тиоредоксин, линкер с His-тагами, сайт тромбина LVPR*GS; инфестин-4 находится на С-конце белка (GenBank KJ183178).

Таблица 9. Олигонуклеотиды для клонирования гена инфестина-4 в вектор pET32a и для ПЦР-мутагенеза гена инфестина-4

Олигонуклеотид	5' – 3' последовательность
AS-KAZ-1F	<u>ttgctagcgactaca</u> aaagatgatgacgataaagaggttc <u>gtaacccatgcgctt</u>
AS-KAZ-2R	<u>tgccatacgtttgccat</u> cagaaccgcacaccggaacgtagtacggaagcaagcgc <u>atgggttacg</u>
AS-KAZ-3F	<u>tggcaaacgtatggca</u> accgctgcatgctcaactgtgctgcacagacgaaagtgccaggtctgaaa
AS-KAZ-4R	<u>ttagaactgttccac</u> gttgaacgctgacaacgaccttcgtggaccagttcagacctggcacttt
AS-KAZ-5R	<u>ttaagcttctattaga</u> actgttcca
MutAFor	<u>gcttgctccgctcgcttc</u> ggtgcggtgtgcggttctgatggc
MutARev	<u>gcacaccgcaacgaagc</u> gacggaagcaagcgc <u>atgggttacg</u>
MutBFor	<u>gcttgccgcaacgaag</u> tacgggtgtgtgcggttctgatggc
MutBRev	<u>gcacaccgcaacgaag</u> tacgggtgcaagcgc <u>atgggttacg</u>
MutCFor	<u>gcttgcaaccgctcgct</u> acgttccggtgtgcggttctgatggc
MutCRev	<u>gcacaccggaacgtagc</u> gacgggtgcaagcgc <u>atgggttacg</u>
Mut15For	<u>gcttgcaaccgctcgct</u> tcggtggtggtggttctgatggc
Mut15Rev	<u>gcacaccgcaacgaagc</u> gacgggtgcaagcgc <u>atgggttacg</u>
VectorFor	cagc <u>acatggacagccc</u> agatctggg
VectorRev	ggtgctcgagtgcgccgcaagcttc

Сайты рестрикции выделены *курсивом*; перекрывающиеся комплементарные участки подчеркнуты; внесенные мутации в последовательность гена инфестина-4 выделены **жирным шрифтом**.

Чтобы внести замены аминокислотных остатков Phe9, Asn11, Tyr12 и Pro14 в протеазасвязывающей петле дикого типа инфестина-4 (wt-Inf4) и создать новые варианты белка, слитого с Trx: Мутант 15 (GenBank KJ183179), Мутант А (GenBank KJ183180), Мутант В (GenBank

KJ183181) и Мутант С (GenBank KJ183182), был использован ПЦР-мутагенез плазмиды рЕТ32-Inf4 [155]. Для создания каждого мутанта используется пара праймеров, комплементарных последовательности вектора, и пара праймеров, которые имеют на 5'-концах взаимно комплементарные участки длиной 30 нуклеотидов, содержащие вносимые мутации (Таблица 9). Сначала проводилась амплификация (температура отжига в ПЦР – 65 °С) фрагмента ДНК длиной 165 п.н. с помощью вектор-специфичного праймера VectorFor и одного из обратных праймеров, содержащих мутацию – MutRev; также амплифицировался фрагмент длиной 181 п.н. с помощью одного из прямых праймеров MutFor и вектор-специфичного обратного праймера VectorRev. Полученные фрагменты далее отжигали друг на друга при 65 °С (за счет комплементарных участков, внесенных парой праймеров MutFor и MutRev) и амплифицировали с праймерами VectorFor и VectorRev для получения конечного продукта 320 п.н. Полученный фрагмент, который содержит сайт рестриктазы NcoI на расстоянии 20 п.н. от 5'-конца, клонировали в рЕТ32a по сайтам NcoI и HindIII. Полученные таким образом плазмиды рЕТ32-MutA, -MutB, -MutC и -Mut15 трансформировали в компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3), которые высевали на агаризованную среду LB с ампициллином. Правильность вставки была подтверждена ПЦР-скринингом и секвенированием.

Штамм-продуцент *E. coli* BL21 (DE3)/рЕТ32a-Inf4 высевали в 2 мл жидкой среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и выращивали клеточную культуру при перемешивании 180 об/мин в течение 16 часов при 37°C. По 0,5 мл полученной культуры инокулировали в 0,5 л колбы с 150 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и выращивали при 37 °С и перемешивании 230 об/мин до достижения оптической плотности культуры при 600 нм, равной 1,0 (примерно в течение 3 часов). Экспрессию целевого белка в клетках индуцировали 1 мМ ИПТГ, после чего клетки выращивали дополнительно 4 часа (оптическая плотность культуры при 600 нм при этом составляла примерно 2,0). До и после индукции отбирали по 1 мл и по 0,5 мл культуры, соответственно, для последующего анализа электрофорезом (пробы «0ч индукции» и «4ч индукции»). Пробы подготавливали, центрифугируя образцы культуры на настольной центрифуге при 13000 об/мин в течение 3 минут, после чего осадок клеток доводили водой до 50мкл и добавляли 25мкл 3-кратного буфера для нанесения на полиакриламидный гель (ПААГ). Перед электрофорезом пробы хранили при -20 °С.

Из полученного объема культуры с наработанным целевым белком (150 мл) получали осадок клеток с помощью центрифугирования в течение 10 мин при 3200 g и 4 °С, который хранили при -80 °С. Для выделения рекомбинантного белка осадок размораживали на льду и ресуспендировали 15 мл холодного (4 °С) буфера для выделения белков (50 мМ Трис рН 7,4; 500 мМ NaCl; 10 мМ имидазола), стерилизованного фильтрацией через мембрану 0,2 мкм. Для

ингибирования клеточных протеаз добавляли фенилметилсульфонилфторид (PMSF) до 0,1 мМ. Далее на льду проводили разрушение клеток и геномной ДНК в несколько этапов при помощи ультразвукового диспергатора со следующими настройками: импульсы ультразвука длительностью 1 сек с перерывом 1 сек, амплитудой 20 % от максимальной, подавались в течение 1 минуты, после чего следовал перерыв в 1 мин. Количество этапов ультразвукового разрушения было выбрано равным 10. Подбор количества этапов осуществляли следующим образом: после пятого, восьмого и десятого одноминутного этапа разрушения из лизата клеток отбирали по 300 мкл, центрифугировали 30 мин при 11000 об/мин и 4 °С, отбирали по 200 мкл надосадка и анализировали, насколько увеличилось количество ДНК и белка в надосадке вследствие разрушения клеток. Для анализа количества ДНК надосадок разводили водой в 100 раз и измеряли его поглощение в ультрафиолетовой части спектра; ДНК отвечает за пик при 258 нм в спектре поглощения. Для анализа количества белка 20 мкл надосадка, предварительно разведенного водой в 10 раз, смешивали с 1 мл реагента Брэдфорда и измеряли поглощение света в видимом диапазоне [156]. Как показано на Рисунке 17, после 8 – 10 этапа разрушения ультразвуком количество ДНК и белка в надосадке лизата перестает увеличиваться, что говорит о полном разрушении всех клеток за указанное количество этапов.

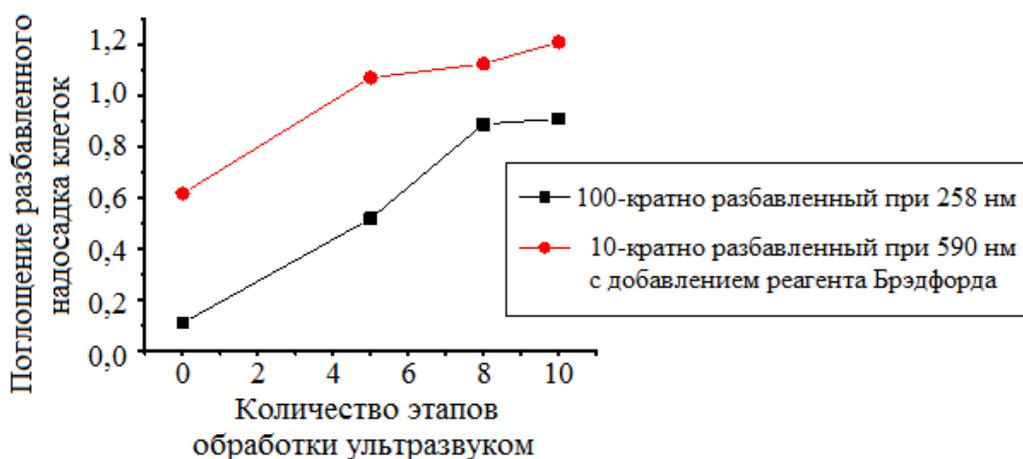


Рисунок 17. Рост поглощения в разведенной надосадке при 258 нм и 590 нм за счет ДНК (черные точки) и белков (красные точки), вышедших в надосадку из разрушенных клеток *E. coli* BL21 (DE3)/pET32a-Inf4 за указанное количество этапов разрушения ультразвуком.

После полного разрушения лизат клеток центрифугировали в течение 30 мин при 15600 g и 4 °С, чтобы отделить растворимую клеточную фракцию от нерастворимой. Растворимую фракцию фильтровали через мембранный фильтр с порами 0,2 мкм; из нее отбирали 25 мкл и смешивали с 12,5 мкл 3-кратного буфера для нанесения на ПААГ (проба «растворимая фракция»). Для анализа состава осадка, который включает тельца включения, его разбавляли в 15 мл воды, гомогенизировали, отбирали 25 мкл и смешивали с 12,5 мкл 3-кратного буфера для

нанесения на ПААГ (проба «нерастворимая фракция»). Очистку рекомбинантного белка осуществляли нанесением 15 мл растворимой фракции лизата на колонку, заполненную на 3 мл сорбентом – агарозой, конъюгированной с нитрилтриацетатом, который хелатирует ионы никеля (Ni-NTA). Данный сорбент, уравновешенным буфером для выделения белков, содержит хелатированные ионы никеля, которые связывают полигистидиновый таг рекомбинантного белка [157]. После инкубации лизата с сорбентом в течение 30 мин при комнатной температуре с колонки собирали проскок с не связавшимися белками; для анализа 25 мкл проскока смешивали с 12,5 мкл 3-кратного буфера для нанесения на ПААГ («проскок»). Сорбент отмывали от белков, связавшихся неспецифически, т.е. не содержащих полигистидиновый таг: сначала наносили 15 мл буфера для выделения белков, после – 15 мл этого буфера, куда дополнительно был добавлен имидазол до концентрации 30 мМ. Собранные после промывки фракции проскока (по 25 мкл) сохраняли для анализа (пробы «Отмывка 10 мМ имидазола» и «Отмывка 30 мМ имидазола»). После отмывки отбирали 5 мкл суспензии сорбента, добавляли 45 мкл воды и 25 мкл 3-кратного буфера для нанесения на ПААГ (проба «Сорбент после отмывки»). Далее проводили 7 этапов элюции связавшегося белка по 2 мл буфера для выделения белков с добавлением имидазола до концентрации 200 мМ. Имидазол, конкурируя с остатками гистидина, связывается с Ni-NTA сорбентом и вытесняет рекомбинантный белок с полигистидиновым тагом в раствор. Для анализа отбирали по 5 мкл фракций элюата, добавляли по 20 мкл воды и 12,5 мкл буфера для нанесения (пробы «Элюция 1 – 7»). Также отбирали 50 мкл суспензии сорбента для пробы «Сорбент после элюции, 10х». Очистка и регенерация сорбента Ni-NTA осуществлялась буфером для удаления ионов никеля (50 мМ ЭДТА-Na pH 8,4), промывкой сорбента водой и 0,1 М гидроксидом натрия, после чего добавляли 0,1 М NiSO₄, чтобы ионы никеля связались с сорбентом, и промывали водой.

Все собранные фракции элюированного белка смешивали и проводили смену буферного раствора с имидазолом на буфер для хранения белков (200 мМ Hepes pH 7,4; 150 мМ NaCl) при помощи ультрафильтрации: белковый раствор, помещенный в кассету Amicon Ultra Centrifugal Filters (EMD Millipore) с порогом пропускания молекул 3 кДа, концентрировали в 5 – 10 раз центрифугированием при комнатной температуре и 5000 g в течение 40 мин; после этого в 1 – 2 мл полученного концентрата добавляли 10 мл буфера для хранения белков и снова центрифугировали в таком же режиме; последнюю операцию повторяли еще 2 раза. При необходимости препарат Trx-Inf4 очищали вторым этапом хроматографии на колонке Tricorn 10/100 (GE Healthcare) с сильным анион-обменным носителем SOURCE 30Q, уравновешенным буфером для хроматографии (20 мМ Tris-HCl pH 8,0). Концентрацию очищенного белка Trx-Inf4, который хранили при -20 °С, определяли по поглощению ультрафиолетового света 280 нм,

исходя из молярного коэффициента экстинкции $18740 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ (поглощение раствора Trx-Inf4 с концентрацией 1 мг/мл – 0,726); она составляла 10 – 14 мг/мл.

Выделение и очистка мутантных форм инфестина-4, слитых с тиоредоксином, (26 кДа) проводилась по таким же процедурам, которые были описаны выше. Дополнительно, Мутант В отщеплялся от тиоредоксина с помощью бычьего тромбина. Реакция расщепления слитого белка проходила в буфере для расщепления тромбином (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 150 mM NaCl; 2,5 mM CaCl_2) при инкубации с перемешиванием раствора Trx-Мутант В (2 мг/мл) и тромбина (1 ед./мл – соответствует концентрации тромбина около 10 нМ) в течение 20 часов при 4 °С. Далее в реакционную смесь добавляли 1 мкМ Н-D-фенилаланил-пролил-аргинил хлорометилкетона (PPACK), который является необратимым ингибитором тромбина, связывающимся с ним в отношении 1 : 1. Контроль степени ингибирования тромбина с помощью PPACK проводили с использованием хромогенного субстрата тромбина, который добавляли к следующим образцам, отобранным на разных этапах реакции отщепления: 1) препарат Trx-MutB до добавления тромбина; 2) разбавленная в 20 раз реакционная смесь с целевым белком и тромбином, до добавления PPACK (наибольшая возможная активность тромбина в образце – 0,05 ед./мл); 3) положительный контроль, содержащий 0,05 ед./мл бычьего тромбина; 4) реакционная смесь после инактивации тромбина. Активность тромбина измерялась при 37 °С по скорости расщепления хромогенного субстрата, вычисляемой как скорость изменения оптической плотности при 405 нм. Для очистки препарата Мутанта В от других продуктов реакции смесь наносили на колонку SP Sepharose HiTrap (GE Healthcare) со скоростью 0,5 мл/мин, после чего промывали колонку буфером для хроматографии. Целевой продукт собирали во фракции проскока и наносили на колонку Tricorn 10/100 с носителем SOURCE 15Q (GE Healthcare), после чего концентрировали Мутант В, очищенный от тромбина, PPACK и тиоредоксина.

2.3. Компьютерное моделирование молекулярной динамики одиночных белков и белок-белковый докинг

2.3.1. Молекулярная динамика ингибиторов фактора XIIa

Работа по моделированию молекулярной динамики ингибиторов и белок-белковому докингу ингибиторов с протеазами была проведена в сотрудничестве с Софьей Владимировной Луцкиной, к.х.н., с.н.с. ФГБУН Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук. Перед проведением процедуры молекулярной динамики (МД) были подготовлены структуры восьми ингибиторов фXIIa: инфестина-4 и четырех его мутантов, КТИ, СМТИ-III и ЛСТИ-III. Модели инфестина-4 и его мутантов были построены на основе

кристаллической структуры дикого типа инфестина-4: PDB ID 2ERW, разрешение 1,40 Å [100], в которой замена аминокислотных остатков производилась вручную с последующей энергетической оптимизацией структуры. Первые три остатка в последовательности инфестина-4, которые не разрешены в кристаллической структуре, были восстановлены с помощью модуля psfgen программы VMD [158]. Трехмерная структура СМТИ-I (PDB ID 1LU0, разрешение 1,03 Å [112]) была использована для построения структуры ингибиторов СМТИ-III (с помощью внесенных вручную замен Leu8Met и Glu9Lys) и LCTI-III (замены Val2Ile, Leu8Met, Lys11Ser, Lys12Ser, Val21Ile, His25Asn и Tyr27Phe).

Моделирование динамики полученных структур проводили после построения ячейки в форме прямоугольного параллелепипеда вокруг молекулы ингибитора; окружение ингибитора в ячейке составляли молекулы воды, разрешенные в кристаллической структуре, и дополнительные молекулы воды, добавленные так, чтобы минимальное расстояние от белковой молекулы до края ячейки было равно 10 Å. Также, чтобы добиться электрической нейтральности системы, в окружение ингибитора были добавлены ионы Na и Cl до концентрации 0,15 M. Моделирование молекулярной динамики ингибиторов осуществлялось с помощью программного обеспечения NAMD 2.9 [159] в силовом поле CHARMM36 [160] при использовании модели воды TIP3P. При моделировании был использован ансамбль NPT, в котором фиксированы количество частиц, давление (1 атм.) и температура (298K), при периодических граничных условиях. Вычисления проводились на суперкомпьютере «Ломоносов» [161]. В ходе моделирования сначала система подвергалась минимизации энергии в течение 1000 шагов, после чего, фиксируя все атомы белка, кроме мутированных остатков, проводили уравнивание растворителя в течение 1 нс. После этого систему подвергали минимизации энергии в течение 5000 шагов и последующему вычислению молекулярной динамики в течение 150 нс при 298 K. Траектории системы в течение 150 нс были использованы для анализа конформационных изменений и внутримолекулярных взаимодействий в молекулах ингибиторов. А для получения стабилизированной структуры ингибитора (чтобы использовать ее при белок-белковом докинге с протеазой) моделирование молекулярной динамики проводилось при постепенном снижении температуры системы от 298 K до 4 K за 30 нс.

2.3.2. Белок-белковый докинг ингибиторов с факторами XIIa, XIa и тромбином

Была использована модель структуры фXIIa, построенная по гомологии (47 % идентичности аминокислотных последовательностей) с активатором фактора роста гепатоцитов (PDB ID 2R0L, разрешение 2,2 Å [162]). Такая структура [163] была использована для докинга со

структурами дикого типа инфестина-4 и его мутантов, КТИ и ингибиторов из семейства тыквенных, которые были получены с помощью моделирования молекулярной динамики, как было описано выше. Также был проведен докинг структур ингибиторов со структурами фХа (PDB ID 2JKH, разрешение 1,25 Å [164]) и тромбина (PDB ID 3U8O, разрешение 1,28 Å [165]).

Белок-белковый докинг проводили с помощью трех ресурсов: ClusPro [166], Rosetta [167] и ruDock [168], причем при докинге на ресурсах ClusPro и ruDock были наложены ограничения на положение остатков P¹ и P^{1'} ингибитора таким образом, чтобы они располагались вблизи от каталитических остатков Ser и His протеазы. Однако, по результатам докинга на ресурсе ruDock большинство полученных комплексов протеаза-ингибитор были некорректными, потому что ингибитор располагался вдали от активного центра протеазы. Большинство результатов гибкого докинга на ресурсе Rosetta также было некорректным, потому что в полученных комплексах каталитические остатки протеазы находились на достаточно большом расстоянии друг от друга, что является артефактом, так как в такой конформации протеаза была бы неактивной. Результаты, полученные с помощью ресурса ClusPro, были наиболее корректными, и только они приведены ниже. Визуализация молекулярной графики и структур белков проводилась с помощью программных пакетов VMD и PyMOL [169].

2.4. Влияние ингибиторов фактора XIIa на систему свертывания

2.4.1. Определение констант ингибирования с помощью хромогенного теста

Для изучения селективности очищенных ингибиторов фXIIa была определена их ингибирующая активность против 10 сериновых протеаз, связанных со свертыванием. 50 мкл раствора протеазы смешивали в 2-кратном буфере для хромогенного теста (конечная концентрация в реакционной смеси 50 мМ Tris-HCl pH 7,4, 130 мМ NaCl, 0,5 % бычьего сывороточного альбумина) с различными концентрациями ингибитора в объеме 50 мкл (0,5 нМ – 50 мкМ), после чего инкубировали смесь в лунке 96-луночного планшета (Corning; США) при 37 °С в течение 15 мин. Хромогенный субстрат, соответствующий данной протеазе и растворенный в 100 мкл воды, добавляли к смеси и с помощью микропланшетного ридера Sunrise (Тесан; Австрия) измеряли кинетику образования p-нитроанилина (pNA) по поглощению конечным раствором света с длиной волны 405 нм. Конечные концентрации каждой протеазы и ее субстрата в объеме 200 мкл показаны в Таблице 10. Начальная скорость гидролиза субстрата, V , которая определялась по начальному наклону кривой образования pNA, была нормирована на

значение скорости при нулевой концентрации ингибитора и отложена против концентрации ингибитора. Эта кривая была аппроксимирована уравнением:

$$V (\%) = 100 \% / (1 + I/IC_{50}), \quad (1)$$

где I – начальная концентрация ингибитора; IC_{50} – концентрация ингибитора, вызывающее 50 % ингибирование амидолитической активности протеазы.

Константа ингибирования K_i вычислялась по уравнению Ченга-Пруссоффа [170]:

$$K_i = IC_{50} / (1 + S/K_m), \quad (2)$$

где S – начальная концентрация субстрата; K_m – константа Михаэлиса для данной пары протеаза-субстрат.

Величина стандартного отклонения (SD) для значения константы ингибирования K_i вычислялась, учитывая ошибки измерения IC_{50} и K_m , как корень квадратный из выражения $(\Delta IC_{50} / (1 + S/K_m))^2 + n \times (K_i / (1 + K_m/S) \times \Delta K_m / K_m)^2$, где ΔIC_{50} – величина SD для IC_{50} ; ΔK_m – стандартная ошибка среднего (SE) для K_m ; n – количество повторов.

Таблица 10. Протеазы свертывания и других систем, связанных со свертыванием, а также соответствующие хромогенные субстраты этих протеаз

Протеаза	Концентрация протеазы, нМ	Хромогенный субстрат	Концентрация субстрата, мМ	K_m , мМ
фXIIa	1	S-2302	0,2	0,18 ±0,03 (n=4)
фXIa	0,1	S-2366	0,5	0,93 ±0,20 (n=4)
фIXa	200	Spectrozyme FIXa	0,5	0,192 ±0,013 (n=4)
фХа	0,5	S-2765	0,5	0,29 ±0,08 (n=4)
тромбин	0,2	Pefachrome TH 5244	0,02	0,024 ±0,005 (n=7)
фVIIa	200	Spectrozyme FVIIa	0,5	0,86 ±0,39 (n=2)
аПС	1	Spectrozyme PCa	0,2	0,24 ±0,06 (n=4)
калликреин	0,5	S-2302	0,25	0,23 ±0,04 (n=5)
тПА	2	Spectrozyme tPA	0,2	0,40 ±0,07 (n=4)
плазмин	2	S-2366	0,4	0,56 ±0,18 (n=3)

Приведены конечные концентрации в 200 мкл реакционной смеси. Значения констант Михаэлиса, K_m , представлены в виде среднее ± стандартная ошибка (в скобках – число повторов). Опубликовано в [171].

Измерение значений K_m проводилось аналогично выше описанной процедуре, при смешивании протеазы с различными концентрациями соответствующего субстрата (в диапазоне примерно от 0,5 до 3 значений K_m). Скорость расщепления субстрата откладывали против его

начальной концентрации и полученную зависимость аппроксимировали уравнением Михаэлиса-Ментен. Значение K_m находили как параметр аппроксимации.

2.4.2. Оценка эффективности подавления контактной активации в плазме на основе теста активированного частичного тромбопластинового времени

Все процедуры, связанные с забором крови, проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией в рамках протокола, утвержденного Комитетом по этике ЦТП ФХФ РАН и ГНЦ МЗ РФ. Письменное информированное согласие было получено от всех доноров. Плазма крови, полученная от здоровых доноров, подготавливалась в соответствии со стандартными правилами забора крови для коагулометрических тестов [172]. Плазма получалась из крови, при заборе которой использовали 3,8 % цитрат натрия (111 мМ цитрата натрия, рН 5,5; соотношение кровь : цитрат составляло 9 : 1) в качестве хелатора ионов кальция, путем центрифугирования в два этапа: при 400 g в течение 15 мин и при 1600 g в течение 5 мин. Тесты по измерению активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) и протромбинового времени (ПВ) проводился с использованием наборов реагентов «Коагуло-тест» и «Диагем-П», соответственно (НПО «Ренам»; Россия). Перед проведением тестов в плазму добавляли различные концентрации ингибитора контактной активации; для этого 50 мкл плазмы смешивали с 5,6 мкл десятикратного раствора ингибитора и инкубировали с ним 15 минут при 37 °С. При проведении АЧТВ-теста 25 мкл плазмы помещали в кювету коагулометра Helena-C2 (Helena Biosciences Europe; Великобритания) и смешивали с 25 мкл каолин-кефалиновой смеси (смесь суспензии глины и фосфолипидов мозга). Эта смесь активировала фХII в течение трех минут инкубации при 37 °С, после чего тест запускался добавлением 25 мкл хлорида кальция 25 мМ. Измеряли время образования фибринового сгустка в кювете, который регистрировался фотометрически. Далее были построены зависимости величины АЧТВ от концентрации добавленного в плазму ингибитора. При проведении ПВ-теста 25 мкл плазмы в кювете коагулометра смешивали с 50 мкл раствора тромбопластина (тканевого фактора из мозга кролика) и кальция, сразу же после этого начинали измерять время образования сгустка.

2.4.3. Оценка влияния ингибиторов фактора ХIIа на разные пути активации свертывания методом тромбодинамики

Влияние ингибитора контактной активации на пространственный рост сгустка фибрина изучали при помощи лабораторной системы «Регистратор тромбодинамики Т-2» (ООО «Гемакор», Москва, Россия), руководствуясь описанием к «Диагностическому набору для

исследования тромбодинамики в плазме крови». Детальная методика подготовки плазмы и проведения исследования была опубликована ранее [13, 88, 173]. Вкратце, перед экспериментом 120 мкл плазмы крови, свободной от тромбоцитов, смешивали с ингибитором контактной активации и инкубировали 15 минут при 37 °С. Непосредственно перед экспериментом в плазме восполняли свободную концентрацию ионов кальция до величины около 2 мМ. После этого плазму немедленно переносили в прозрачную кювету при температуре 37 °С и активировали рост сгустка фибрина вставкой-активатором, которую опускали в кювету таким образом, чтобы с плазмой контактировал нижний торец вставки, на котором иммобилизован ТФ [174]. Одновременно с этим запускалась фотосъемка образования сгустка в плазме, длившаяся 30 минут.

Фибриновый сгусток регистрировался темнопольной видеомикроскопией. В плазме наблюдался фронтальный рост сгустка от активатора («сгусток от ТФ»); для этого процесса строился график: против времени, прошедшего с начала опыта (мин), откладывался размер сгустка, измеренный в направлении роста (мкм). Параметры, описывающие этот процесс, включали лаг-тайм (мин) и скорость распространения фронта сгустка (мкм/мин). Также наблюдался другой процесс – возникновение фибриновых сгустков в плазме крови вдали от активатора («независимые от ТФ сгустки»); для этого процесса на графике против времени (мин) откладывали общую площадь кюветы, занятую такими сгустками (%), и фиксировали характерное время возникновения ТФ-независимых сгустков.

2.4.4. Постановка теста генерации тромбина

Исследование генерации тромбина проводилось по методике, описанной в работе [173]. В 2960 мкл размороженной плазмы, бедной тромбоцитами (PPP, от «platelet poor plasma») добавляли 740 мкл флуорогенного субстрата тромбина Z-Gly-Gly-Arg-AMC, который был предварительно растворен до концентрации 2,5 мМ в буфере для субстрата: 18 мМ HEPES pH 7,5, 130 мМ NaCl, 10 % диметилсульфоксида (DMSO). Эта смесь инкубировалась при 37 °С с различными концентрациями ингибиторов (Мутанта В, КТИ) или с буфером для растворения ингибиторов (30 мМ HEPES pH 7,4); после инкубации по 100 мкл смеси помещали в лунки 96-луночного планшета. Генерация тромбина инициировалась добавлением 20 мкл активатора, который содержал CaCl₂ (конечная концентрация в 120 мкл – 16,7 мМ) и фосфолипиды (4 мМ; отношение фосфатидилхолина к фосфатидилсерину 80:20). Фосфолипидные везикулы изготавливались по методике, описанной в работе [87].

В опытах с активацией системы свертывания по контактному пути данный активатор также содержал каолин, который предварительно был разбавлен таким образом, чтобы его концентрация в плазме была в 200 раз меньше, чем в стандартном АЧТВ-тесте). В опытах с активацией свертывания по внешнему пути данный активатор содержал ТФ кролика (Ренам; конечная концентрация 5 пМ). Кинетика образования метки, 7-амино-4-метил-кумарина (АМС, длины волн возбуждения λ_{ex} и эмиссии λ_{em} – 355 нм и 460 нм, соответственно), регистрировалась сразу после добавления активатора при 37 °С в течение 60 мин с помощью мультимодального микропланшетного ридера Appliskan (Thermo Scientific; Финляндия). Параллельно с экспериментальной лункой, флуоресценция измерялась в лунках калибратора, который содержал смесь плазмы и субстрата (100 мкл), а также 20 мкл АМС (конечная концентрация в 120 мкл 8 мкМ). Фоновый уровень флуоресценции измерялся в лунках, содержащих смесь плазмы и субстрата (100 мкл), а также 20 мкл буфера для теста генерации тромбина (конечная концентрация 20 мМ Hepes pH 7,5, 145 мМ NaCl). Каждое измерение было дублировано. Вычисление кривых генерации тромбина в экспериментальных лунках производили, последовательно, следующим путем: усредняя дублированные опыты, вычитая фон, преобразуя сигнал флуоресценции в концентрацию АМС и дифференцируя кривую генерации АМС по времени. При вычислении также учитывались потребление флуорогенного субстрата и вклад комплекса тромбина с $\alpha 2$ -макроглобулином в расщепление субстрата.

2.4.5. Исследование тромбоэластографии

Тест тромбоэластографии проводился с помощью анализатора гемостаза TEG 5000 (Haemoscore; США). Влияние Мутанта В на свертывание изучалось на образцах размороженной нормальной PPP и восстановленной лиофильной плазмы с иммуно-деплетированным фХII (Ренам). При изучении свертывания по контактному пути (от поверхностей анализатора), 330 мкл нормальной PPP инкубировали при 37 °С с различными концентрациями Мутанта В и КТИ или с растворителем белков (30 мМ Hepes pH 7,4), после чего помещали данную смесь в термостатируемую емкость анализатора, содержащую 30 мкл 200 мМ CaCl₂. При изучении свертывания по пути ТФ, 300 мкл плазмы с деплетированным фХII инкубировали таким же образом с ингибиторами фХIIa, после чего помещали ее в емкость анализатора, содержащую 30 мкл 200 мМ CaCl₂ и 30 мкл ТФ (Ренам; конечная концентрация в объеме 360 мкл – 0,6 пМ). Измерение вязкоупругих свойств сгустка длилось 80 мин, по результатам измерения определяли следующие значения: время реакции (лаг-тайм) R (мин), время образования сгустка K (мин), угол наклона α (°) и максимальная амплитуда размера сгустка MA (мм).

2.4.6. Забор крови в пробирку, содержащую Мутант В в качестве антикоагулянта

Цельную свежую кровь забирали без использования хелатирующего антикоагулянта из локтевой вены в пробирку Vacuette с иглой размера 21G (Greiner Bio-One; Германия); сразу после забора по 0,7 мл свежей крови помещали в 1,5-мл полипропиленовые пробирки (Ахуген; США), содержавшие 78 мкл раствора ингибитора фХIIа или растворителя (30 мМ Нерес рН 7,4). Вертикально стоящие пробирки вращали вокруг горизонтальной оси с угловой скоростью 10 оборотов в минуту и визуально регистрировали момент образования сгустка. Для каждого из трех доноров, образцы крови повторно использовали в каждой группе от 1 до 4 раз. Разницу времен свертывания оценивали с помощью рангового критерия Вилкоксона.

2.5. Действие ингибиторов трансглутаминаз на тромбоциты с фосфатидилсеринном

Тромбоциты выделяли из крови здоровых доноров, взятой с использованием 3,8 % цитрата натрия в качестве антикоагулянта; также в кровь перед выделением тромбоцитов добавляли простагландин E1 (1 мкМ) и апиразу (0,1 ед./мл), предотвращающие активацию тромбоцитов в ходе манипуляций. Богатую тромбоцитами плазму получали центрифугированием при комнатной температуре при 100 g в течение 8 мин, после чего дополнительно добавляли 3,8 % цитратный буфер в соотношении плазма:цитрат 3:1. Тромбоциты осаждали при 400 g в течение 5 мин, ресуспендировали в 300 мкл тромбоцитарного буфера (20 мМ Нерес, 150 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 0,4 мМ NaH₂PO₄, 5 мМ глюкозы, 0,5 % бычьего сывороточного альбумина, рН 7,4). Далее тромбоциты отмывали на гель-фильтрационной колонке диаметра 1 см и высотой 6 см, заполненной сефарозой CL-2B (Sigma-Aldrich; США).

Для исследования поверхностных антигенов на тромбоцитах с помощью проточной цитофлуорометрии, их стимулировали в течение 15 мин с агонистами в буфере, дополнительно содержащем 2,5 мМ CaCl₂, в присутствии флуоресцентно меченых антител. Смесь тромбоцитов анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (BD Biosciences; США), и полученные данные обрабатывали программой WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute; США).

2.6. Статистический анализ

Результаты анализировались программным обеспечением OriginPro v.6 (Microcal Software; США) и были представлены в виде среднего, по меньшей мере, 3 повторных измерений ± стандартное отклонение (SD), если не указано другое.

Глава 3. Результаты

3.1. Получение рекомбинантных ингибиторов фактора XIIa и изучение их свойств

3.1.1. Выбор наиболее эффективной системы экспрессии СМТИ-III

В работе исследованы 4 наиболее активных ингибитора фXIIa: инфестин-4, ингибиторы трипсина из кукурузы (КТИ), тыквы (СМТИ-III) и огурца (LCTI-III). Для проведения исследования созданы системы экспрессии в *E. coli* и оптимизированы процедуры выделения и очистки, позволяющие с высоким выходом получить рекомбинантные инфестин-4 и СМТИ-III в виде слитых белков, имеющих активную конформацию.

Сначала СМТИ-III экспрессировали в штамме *E. coli* BL21(DE3)/pGEX-СМТИ, в котором с плазмиды pGEX-4T-1 происходит наработка белка, слитого с глутатион-S-трансферазой (GST). Аналогичная система экспрессии СМТИ-III в растворенной фракции была предложена ранее [115]. После выбора подходящего клеточного клона, содержащего плазмиду с правильной вставкой гена СМТИ-III (Рисунок 18А; клон № 4), экспрессию рекомбинантного белка, регулируемую *lac*-опероном, индуцировали добавлением к клеткам ИПТГ. Как видно на Рисунке 18Б, рекомбинантный GST-СМТИ-III экспрессируется в бактериальных клетках преимущественно в растворимой форме; при очистке на глутатион-сефарозе часть белка связывается с сорбентом с высокой степенью избирательности. Однако, наличие целевого белка в проскоке говорит о недостаточной емкости колонки. Расщепление слитого белка тромбином происходит с высокой эффективностью, потому что после добавления протеазы уменьшилась масса белка, связанного с колонкой. Однако, детектировать отщепленный СМТИ-III в трех фракциях раствора не получилось, предположительно, из-за быстрого вымывания этого белка из геля (вследствие малой массы белка) или из-за плохого связывания с красителем Кумасси. Детекция СМТИ-III другими методами также затруднительна; этот белок не содержит остатков триптофана, и результаты измерения его концентрации по поглощению света 280 нм и методом Брэдфорда противоречивы. Тем не менее, был проведен диализ собранных фракций, в которых, предположительно, находится отщепленный СМТИ-III, против диализного буфера (50 мМ NH₄HCO₃; 0,1 % ПЭГ-8000; pH 7,8) через мембраны с порогом пропускания 100 – 500 Да. Полученный раствор был высушен под вакуумом и разведен водой до концентрации СМТИ-III оценочно 30 мкМ. Как показало измерение ингибирующей активности такого препарата белка против фXIIa, полученный СМТИ-III имеет константу ингибирования порядка 1 мкМ, что на 1 – 2 порядка выше (ингибирование слабее), чем было опубликовано ранее [116].

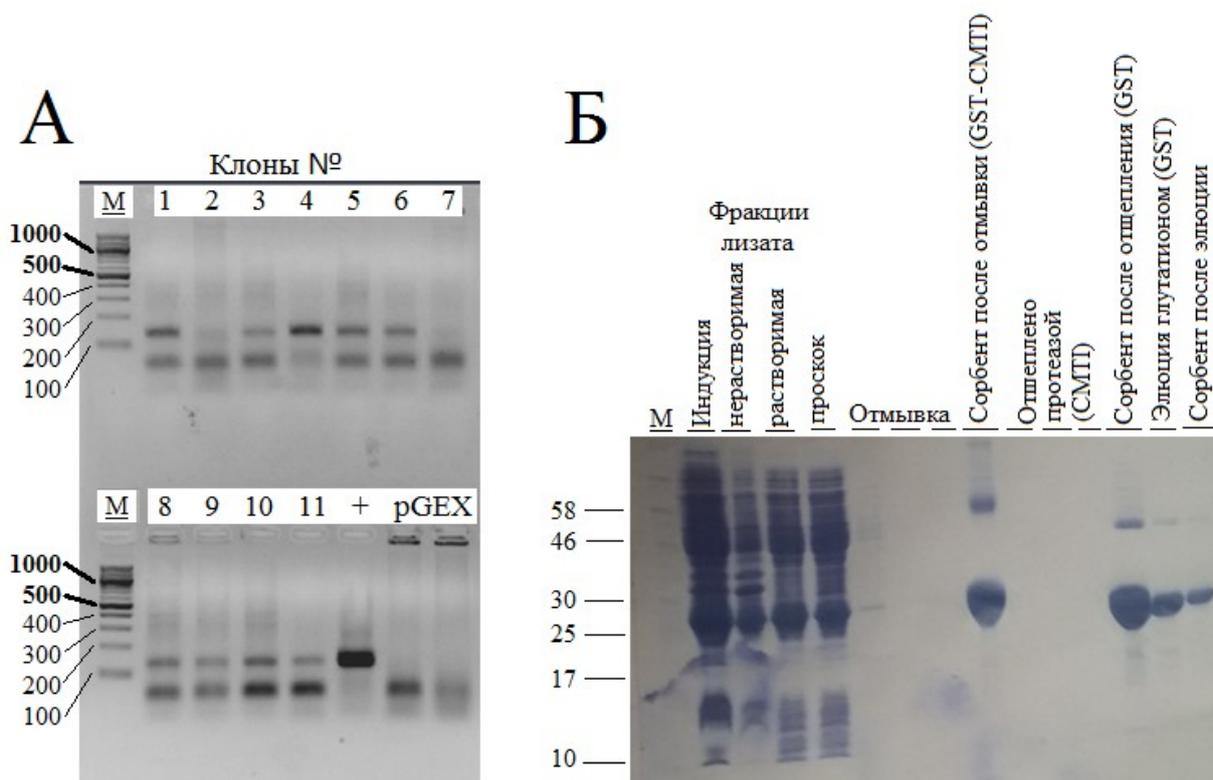


Рисунок 18. Клонирование белок-кодирующей последовательности и экспрессия рекомбинантного белка GST-CMTI-III. (А): ПЦР-скрининг клонов после трансформации смесью для лигирования вектора pGEX-4T-1 и вставки СМТИ. Продукты ПЦР, проведенной с указанных клонов с праймерами 1Fog и 1Rev, анализировались электрофорезом в 1,5 % агарозном геле с TAE-буфером (40 мМ Tris; 20 мМ уксусной кислоты; 1 мМ ЭДТА) и детектировались бромистым этидием. М – маркер длины фрагментов ДНК (длины показаны в п.н.). В качестве матрицы для ПЦР использовались также контрольные образцы: очищенная вставка СМТИ (+) и очищенная плаزمида pGEX. (Б): Выделение из клеток, очистка и расщепление на глутатионовой колонке белка GST-CMTI-III. Образцы клеточного лизата, нерастворимой и растворимой фракций лизата, несвязавшихся с колонкой белков и ее отмывки, сорбента со связавшимся белком GST-CMTI-III и с расщепленным белком GST, с отмытым белком СМТИ-III и с элюированным белком GST, анализировались электрофорезом в 12,5 % ПААГ с окраской Кумасси. М – маркер массы белков (в кДа).

Чтобы повысить эффективность связывания целевого белка с сорбентом, СМТИ-III получен в интеиновой системе, в которой он экспрессируется в виде слитого белка с интеином и хитин-связывающим доменом (CBD). CBD служит для очистки белка на колонке с иммобилизованным хитином, а интеин, самосплайсирующий белковый элемент, служит для отщепления СМТИ-III при добавлении тиол-восстанавливающих агентов. Слитый белок экспрессировался при 37 °С преимущественно в нерастворимой фракции, в то время как полипептид, содержащий только интеин и CBD, был растворимым (Рисунок 19А). Растворимость СМТИ-интеина значительно повысилась, когда его экспрессию индуцировали при пониженной температуре 18 °С (Рисунок 19Б). При этом белок с высокой эффективностью и избирательностью связывается с хитиновой колонкой. После отщепления интеина добавлением 1мМ DTT снова не удалось детектировать

белок Met-СМТИ-III-Ala во фракции элюата с помощью окраски Кумасси. После смены буфера в элюате и высушивания белка определена его концентрация и вычислен чистый выход Met-СМТИ-III-Ala, составивший 5 мг с 1 литра культуры. Однако, полученный белок не обладал ингибирующей активностью против фХIIа и агрегировал в растворе при попытке рефолдинга.

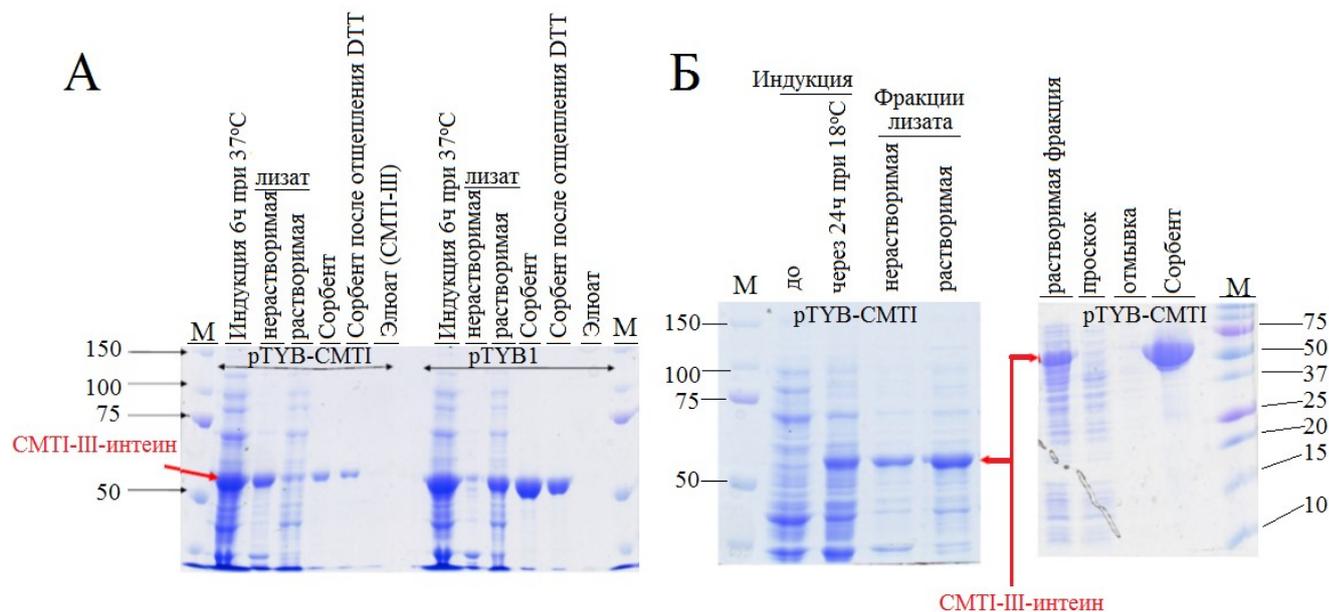


Рисунок 19. Экспрессия и очистка слитого белка СМТИ-III с интеином VMA и хитин-связывающим доменом (CBD) (целевой белок отмечен стрелкой). (А): 7,5 % ПААГ электрофорез при выделении, очистке и отщеплении рекомбинантных белков, экспрессированных штаммами *E. coli* BL21 (DE3)/рTYB-СМТИ и *E. coli* BL21 (DE3)/рTYB1 в течение 6 часов при 37 °С. После отделения растворимой фракции лизата она наносилась на колонку с хитином, с которой связывался целевой белок («сорбент»). На колонке проводилось отщепление интеина при добавлении 1 мМ DTT и инкубации при 4 °С, после чего собирали элюат с отщепленным Met-СМТИ-III-Ala. (Б): 7,5 % и 12,5 % ПААГ электрофорез при экспрессии и очистке слитого белка СМТИ-III с интеином и CBD в течение 24 часов при 18 °С. Растворимая фракция лизата отделялась и наносилась на колонку с хитином («сорбент»); также отбирали фракции проскока и отмывки колонки. М – маркер массы белков (в кДа).

Чтобы решить проблему низкого выхода белка, создана экспрессионная система для получения полипептида, содержащего несколько tandemных повторов последовательности СМТИ-III. Аналогичное решение для экспрессии малых белков в бактериальной клетке было ранее предложено в работе [175], в которой был создан tandemный ген инсулина. Tandемные белки получены с 2, 3, 4 и 5 повторами последовательности СМТИ-III(Met8Leu)-Met и с одним полигистидиновым тагом на N-конце (Рисунок 15А); общая длина полипептидов составила 112, 130, 160 и 195 а.о., соответственно. Tandемные белки СМТИ-III нарабатывались только при пониженной температуре индукции и накапливались только в тельцах включения (Рисунок 20). При этом, например, 5-мерный белок с высокой эффективностью расщеплялся на 1-меры под действием цианоген бромида (CNBr), который разрезает пептидную цепь после остатков

метионина [176]. В результате, выход 1-мерного СМТИ-III(Met8Leu)-Met составил примерно 4 мг с 1 литра культуры. Однако, полученный белок был неактивен и быстро агрегировал в растворе при диализе или рефолдинге.

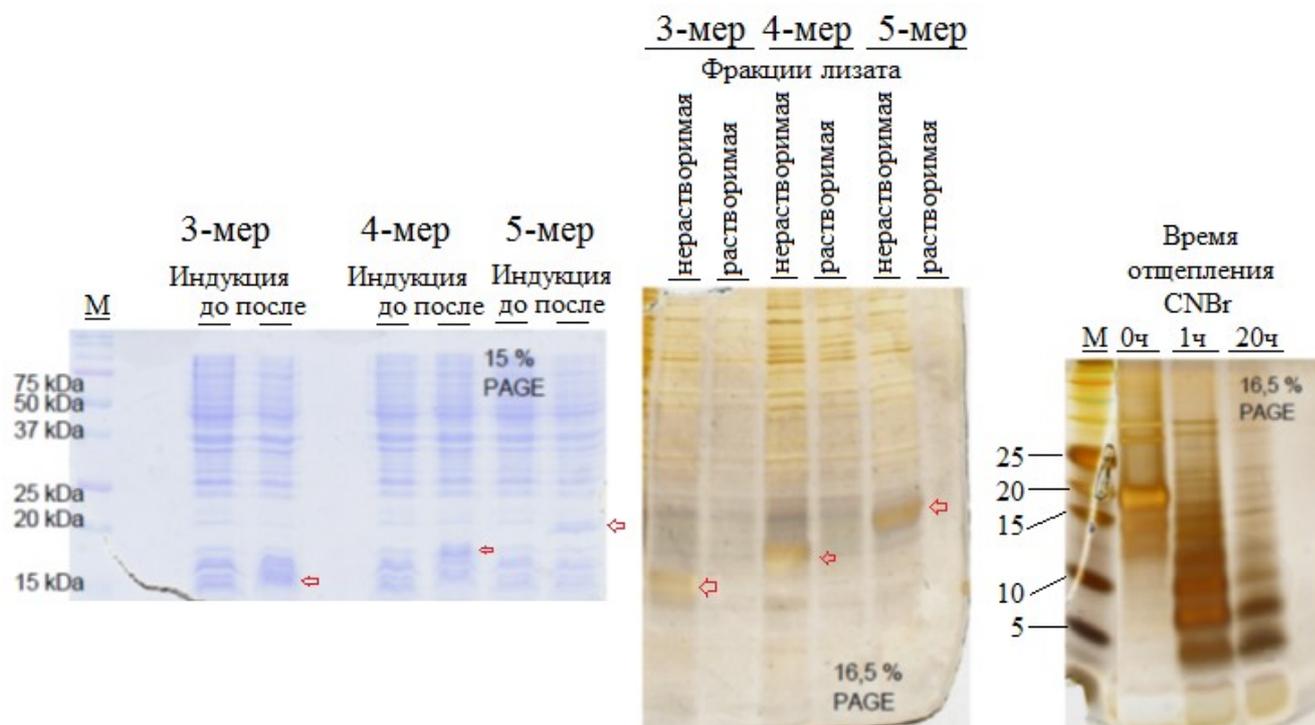


Рисунок 20. Экспрессия и расщепление тандемного белка Nx[СМТИ-III(Met8Leu)-Met] с His-тагом на N-конце. 15 % ПААГ электрофорез с окраской Кумасси при индукции экспрессии 3-мерного, 4-мерного и 5-мерного белка 0,4 мМ ИПТГ в течение 24 часов при 18 °С. Стрелками указаны целевые белки. 16,5 % ПААГ электрофорез с окраской серебром нерастворимой и растворимой фракций клеточного лизата с экспрессированными мультимерными белками. 16,5 % ПААГ электрофорез с фиксацией геля 5 % глутаровым альдегидом и последующей окраской серебром при расщеплении 5-мерного белка цианоген бромидом в течение 1 часа и 24 часов. М – маркер массы белков (в кДа).

Чтобы решить проблемы экспрессии белка в растворимой фракции и в активной конформации, создан слитый белок СМТИ-III с His-тагом на N-конце и с доменом В1 протеина G (GB1), который позволяет получать высокий выход рекомбинантного ингибитора и при этом не снижает активность целевого белка [177]. His-GB1-СМТИ экспрессировался, в основном, в растворимой фракции и был очищен металл-халатной хроматографией (Рисунок 21А); однако, после элюции буфером с 200 мМ имидазола белок агрегировал. После растворения агрегатов 100 мМ 2-меркаптоэтанола проводилась процедура рефолдинга (т.е. правильного сворачивания белка и образования ранее восстановленных дисульфидных мостиков). СМТИ-III эффективно отщеплялся тромбином от His-GB1, связанного с сорбентом, и переходил в раствор. Причем, в данном случае успешно прошла детекция СМТИ-III в 16,5 % ПААГ после фиксации глутаровым альдегидом и окраской серебром (Рисунок 21Б). Кроме того, полученный белок обладал

ингибирующей активностью против фХIIа (эффективная концентрация ингибирования, оценочно, менее 100 нМ), но при этом содержал следы активного тромбина. Чистый выход СМТИ-III после очистки, рефолдинга и отщепления составил 2,5 мг на литр культуры.

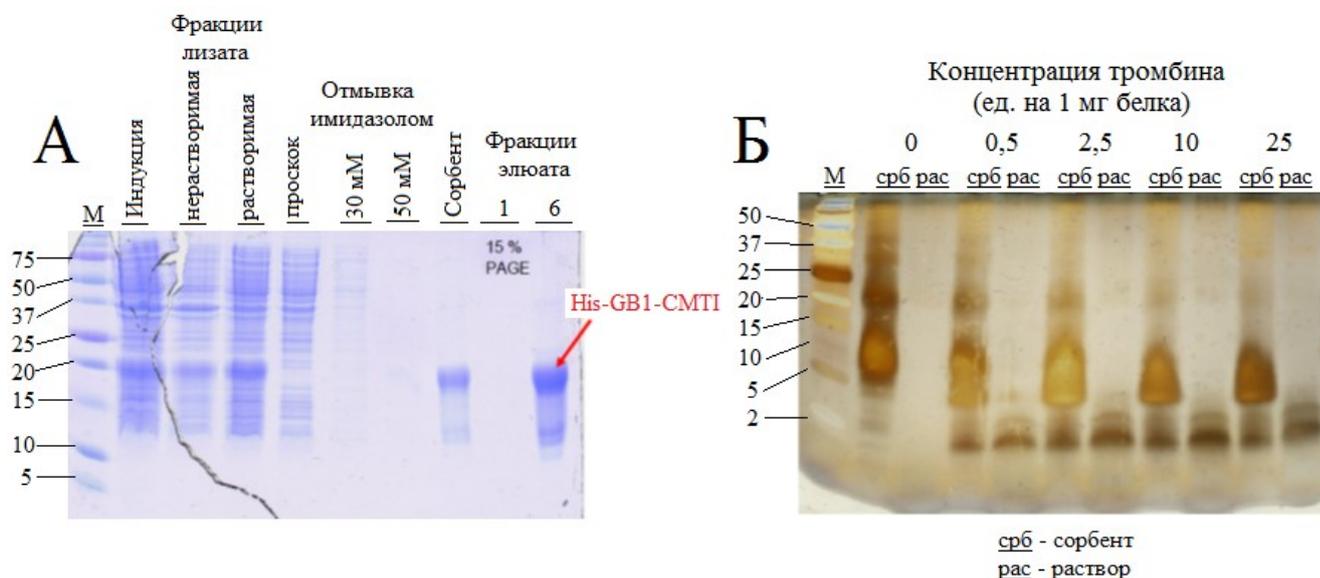


Рисунок 21. Экспрессия, очистка и расщепление тромбином рекомбинантного белка His-GB1-CMTI. (А): 15 % ПААГ электрофорез с окраской Кумасси при индукции 0,2 мМ ИПТГ в течение 40 часов при 18 °С. Стрелкой указан целевой белок, который экспрессировался преимущественно в растворимой форме. Нанесены фракции проскока растворимой части лизата, отмывки 30 и 50 мМ имидазола, сорбента с связанным белком и первая и шестая фракции элюции целевого белка 200 мМ имидазола. (Б): 16,5 % ПААГ электрофорез фракций, связанных с сорбентом («срб») и растворенных в буфере («рас»), при расщеплении целевого белка на колонке тромбином в течение 20 часов при 4 °С. Концентрации тромбина составили 0,5; 2,5; 10 и 25 ед. в расчете на 1 мг целевого белка. Также была проба с отрицательным контролем без тромбина. Фиксация геля глутаровым альдегидом и последующая окраска серебром. М – маркер массы белков (в кДа).

Чтобы усовершенствовать конструкцию полипептида, созданы три варианта, у которых His-таг был перемещен с N-конца; при этом после отщепления тромбином His-таг остается слитым с СМТИ-III, а не с GB1 (Рисунок 22А). Такие изменения помогли бы избавиться от тромбина в получаемом препарате СМТИ-III и, возможно, избежать процедуру рефолдинга. Данные три варианта слитого белка экспрессировались в растворимой и нерастворимой фракциях, после очистки из растворимой фракции от белка был отщеплен GB1 с помощью тромбина. Оказалось, полученные варианты СМТИ-III с разным положением His-тага обладают различной ингибирующей активностью к фХIIа: если His-таг находится на N-конце СМТИ-III, эффективная концентрация ингибирования составляет порядка 50 нМ, в то время как His-таг на С-конце понижает активность в 10 – 100 раз (Рисунок 22Б). В дальнейшем, при исследовании ингибирующих свойств СМТИ-III использовали первоначальный вариант слитого, нерасщепленного, белка His-GB1-CMTI.

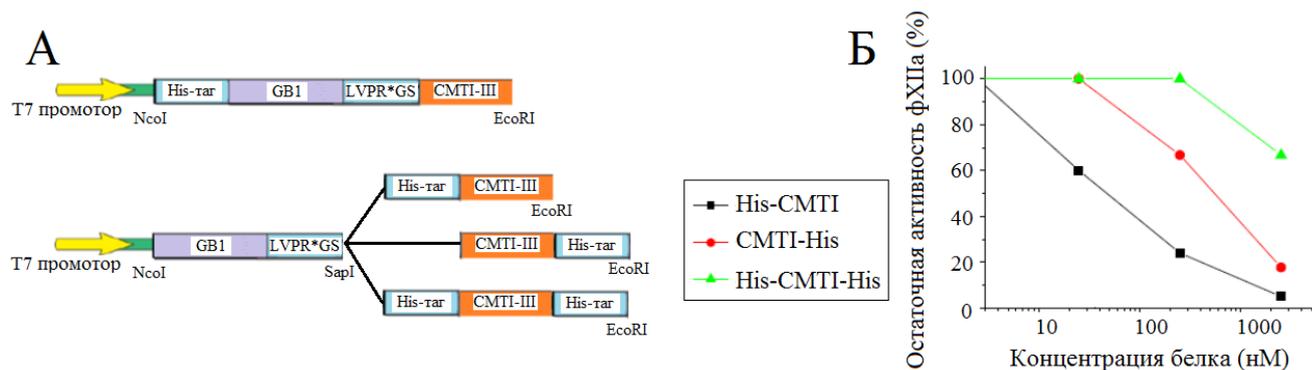


Рисунок 22. Влияние положения His-тага на ингибирующую активность СМТИ-III. (А): Схематическое изображение первоначального варианта последовательности, кодирующей слитый белок His-GB1-CMTI, а также три его модификации: GB1-His-CMTI, GB1-CMTI-His и GB1-His-CMTI-His. На схеме отмечены сайты рестрикции, а также показана последовательность, кодирующая сайт тромбина LVPR*GS, где *отмечена расщепляемая связь. (Б): Результат измерения остаточной amidолитической активности фХПа к субстрату S-2302 (в %) при различных концентрациях (в логарифмическом масштабе) вариантов ингибитора СМТИ-III, отщепленных тромбином от GB1. Белок His-CMTI (черные точки) имеет эффективную константу ингибирования фХПа порядка 50 нМ; СМТИ-His (красные точки) – порядка 500 нМ; His-CMTI-His (зеленые точки) – порядка 5 мкМ.

Таким образом, в данной работе создана наиболее эффективная система экспрессии СМТИ-III, позволяющая получать активный ингибитор даже после одной стадии очистки. Проблема неправильного сворачивания полипептидной цепи СМТИ-III и ее растворимости [114] успешно решена с использованием GB1 домена из *Streptococcus sp.*, который позволяет ингибитору экспрессироваться в бактериальной клетке сразу в активной конформации. При этом попытка экспрессировать СМТИ-III в бактерии в виде одиночного белка была неудачной, что, по-видимому, связано с быстрой деградацией малых белков массой менее 10 кДа в цитоплазме бактерии. Проблема растворимости также была частично решена при экспрессии белка, слитого с GST или CBD, однако с этими слитыми белками, как и при экспрессии тандемного белка в тельцах включения, не был получен активный СМТИ-III. Проблема эффективного связывания белка с сорбентом при очистке решена с помощью His-тага, связывание которого с иммобилизованным никелем значительно выше, чем, например, связывание GST с глутатионом. Причем добавление His-тага на N-конец СМТИ-III не понижает его ингибирующую активность и позволяет провести расщепление тромбином таким образом, чтобы препарат ингибитора не содержал следов протеазы.

3.1.2. Очистка слитого белка инфестина-4 и тиоредоксина и его расщепление

Инфестин-4 экспрессирован в растворимой форме в виде слитого белка с тиоредоксином (Trx). Этот белок является основным в цитоплазме штамма-продуцента и полностью связывается

с никелевым сорбентом (на Рисунке 23 показан пример очистки мутанта ингибитора). Чистота Trx-Inf4 (26 кДа) составляет более 90 %, а чистый выход – примерно 60 мг на литр клеточной культуры.

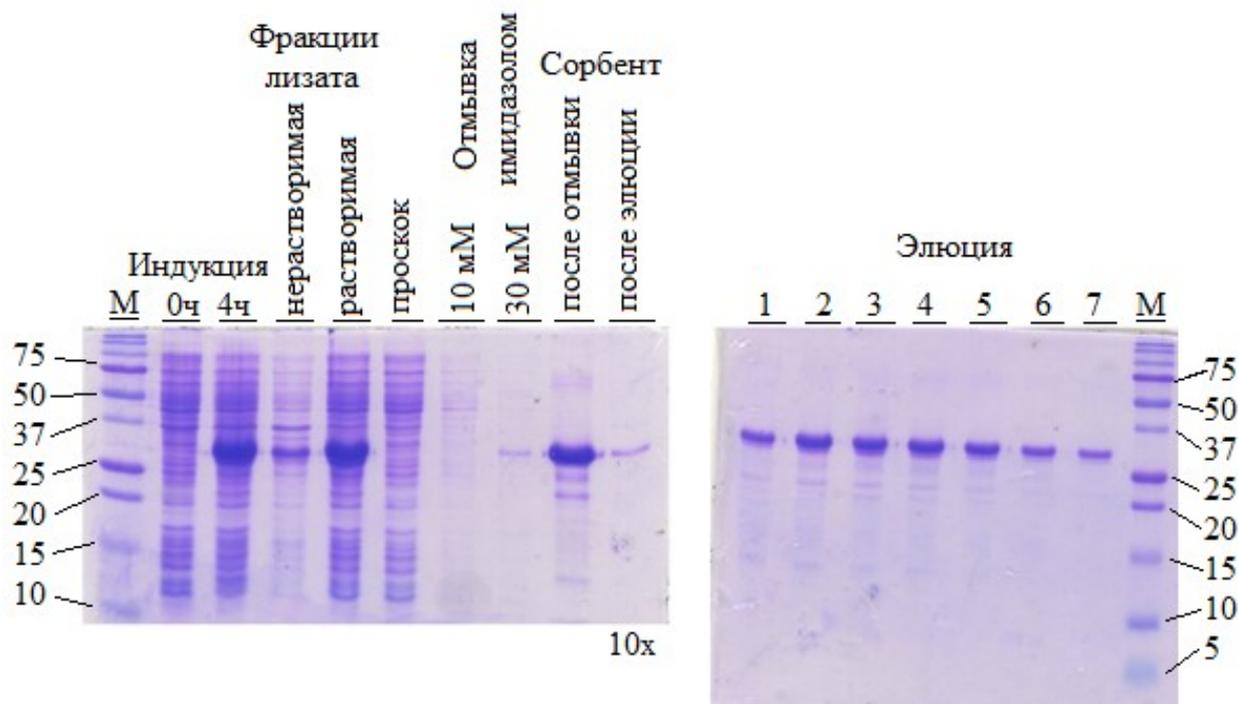


Рисунок 23. ПААГ (12,5 %) электрофорез проб, полученных в ходе выделения и очистки из клеток штамма-продуцента с помощью металл-хелатной хроматографии рекомбинантного варианта инфестина-4, слитого с Trx (в качестве примера приведен Мутант В). М – маркер молекулярного веса (в кДа) Precision Plus Protein Dual Xtra (Bio-Rad; США); пробы (в скобках указан объем нанесенной пробы): до («0ч») и после окончания («4ч») индукции (6 и 3 мкл, соответственно); «нерастворимая» и «растворимая фракции лизата» клеток (по 3 мкл); «проскок» после нанесения на металл-хелатную колонку растворимой фракции (3 мкл); «отмывка 10 мМ» и «30 мМ имидазола» (по 3 мкл); «сорбент после отмывки» и «после элюции белка, 10х» (по 6 мкл); «Элюция, фракции 1–7» (по 3 мкл). Все пробы нанесены в эквивалентном количестве, кроме пробы «Сорбент после элюции», объем которой в 10 раз выше эквивалентного объема («10х»). Опубликовано в [171].

Первичная проверка активности очищенного Trx-Inf4 проведена путем измерения удлинения времени свертывания в плазме по контактному пути под действием различных концентраций ингибитора. Так, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) в нормальной плазме увеличено в 3 раза, если в нее добавлено 20 мкМ слитого белка (Рисунок 24; оранжевые точки). При этом Trx (15 кДа), полученный из контрольного штамма *E. coli* BL21 (DE3)/pET32a по протоколу, описанному для Trx-Inf4, не влияет на времена свертывания вплоть до концентрации 40 мкМ. Препарат Trx-Inf4 не действует на внешний путь свертывания при измерении протромбинового времени (ПВ). Таким образом, с помощью высокоэффективной системы экспрессии получен в растворенной форме активный препарат инфестина-4.

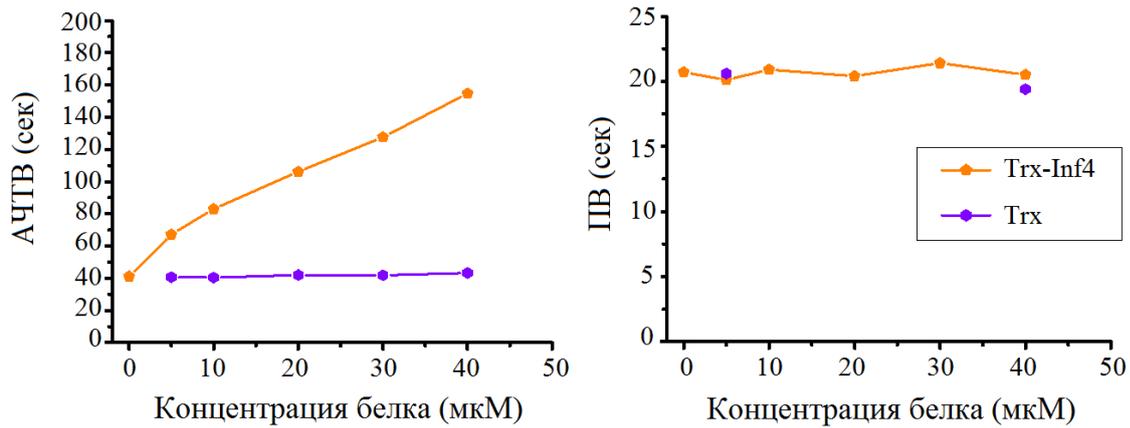


Рисунок 24. Влияние препаратов белков Trx-Inf4 и Trx на времена свертывания по контактному пути (АЧТВ) и по пути ТФ (ПВ).

3.1.3. Селективность ингибирования фактора XIIa каноническими ингибиторами

Ингибирующая активность против фXIIa определена для рекомбинантных Trx-Inf4 и GB1-СМТИ-III, выделенного из кукурузы КТИ и синтетического LСТИ-III в хромогенном тесте по уменьшению скорости расщепления фактором XIIa хромогенного субстрата S-2302. После построения зависимости активности фXIIa от концентрации ингибитора вычислены константы ингибирования, K_i (Таблица 11). Инфестин-4 является самым активным ингибитором, с константой ингибирования $0,113 \pm 0,023$ нМ; КТИ примерно в 4 раза менее активен, в то время как СМТИ-III и LСТИ-III являются относительно слабыми ингибиторами с константами около 10 нМ и выше. Полученные значения K_i согласуются с ранее опубликованными результатами [98, 106, 116]. Для инфестина-4 и КТИ, как наиболее активных ингибиторов фXIIa, определена также ингибирующая активность против сериновых протеаз, связанных со свертыванием: факторов XIa, IXa, VIIa, Xa, тромбина, активного протеина С (аПС), плазменного калликреина, плазмينا, тканевого активатора пламиногена (тПА) (Рисунок 25). Калликреин и тПА не ингибируются этими белками вплоть до концентрации 30 мкМ; при этом инфестин-4 ингибирует 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 слабо ингибирует 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 против фXIIa, то инфестин-4 обладает низкой селективностью – всего около 40, а КТИ – в тысячу раз большей селективностью (40×10^3).

Таблица 11. Ингибирование фХIIа каноническими ингибиторами

Ингибитор	Последовательность петли P ² – P ⁴ '	Константа ингибирования фХIIа, нМ	Концентрация 3-крат. удлинения АЧТВ, мкМ	Оценочная функция докинга, у.е.
КТИ	PRLPWP	0,41 ±0,10	8,5 ±1,6	-1267
LCII-III	PRILME	9,8 ±2,2	35 ±4	-1000
CMII-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 P² – P⁴'; также приведены значения оценочной функции *SF* белок-белкового докинга с модельной структурой фХIIа. Опубликовано в [171].

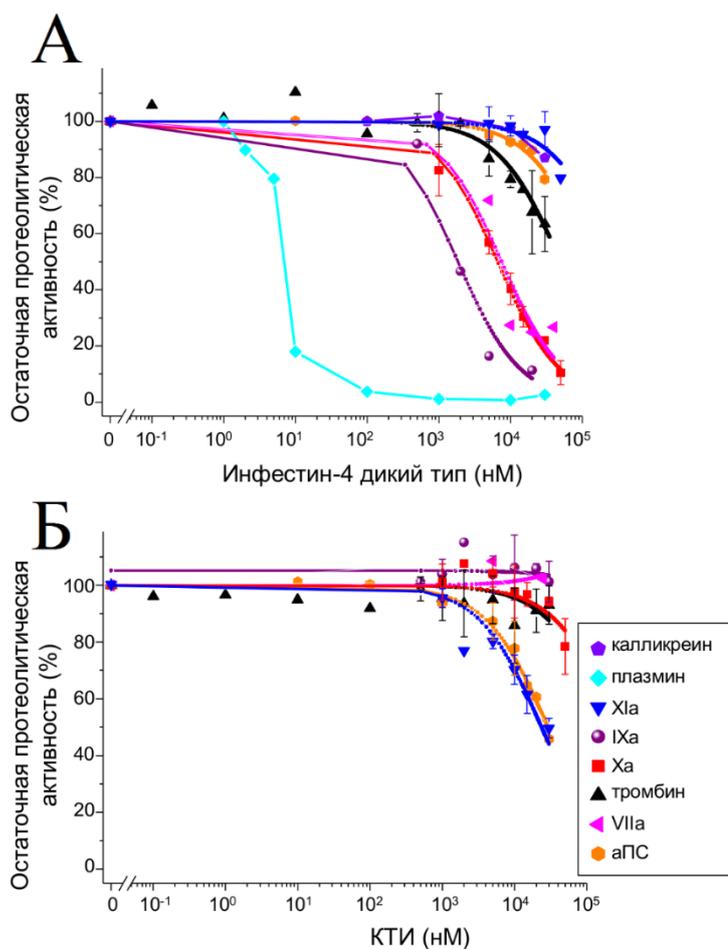


Рисунок 25. Остаточная протеолитическая активность (%) сериновых протеаз, связанных с системой свертывания, при различных концентрациях инфестина-4 (А) и КТИ (Б) (шкала концентраций в логарифмическом масштабе). Опубликовано в [171].

Чтобы оценить специфичность действия указанных ингибиторов не только на отдельные факторы свертывания, но и на динамику всей системы, проведено исследование пространственного роста сгустка фибрина, начинающегося при активации от поверхности с иммобилизованным ТФ, в присутствии таких ингибиторов. Для этого использован метод тромбодинамики, в котором видеосъемкой регистрируется фронтальный рост сгустка в плазме, помещенной в плоскую кювету. Кроме фибринового сгустка, образованного в результате активации ТФ на поверхности, в объеме плазмы также регистрируются сгустки, возникшие из-за контактной активации от стенок кюветы (Рисунок 26).

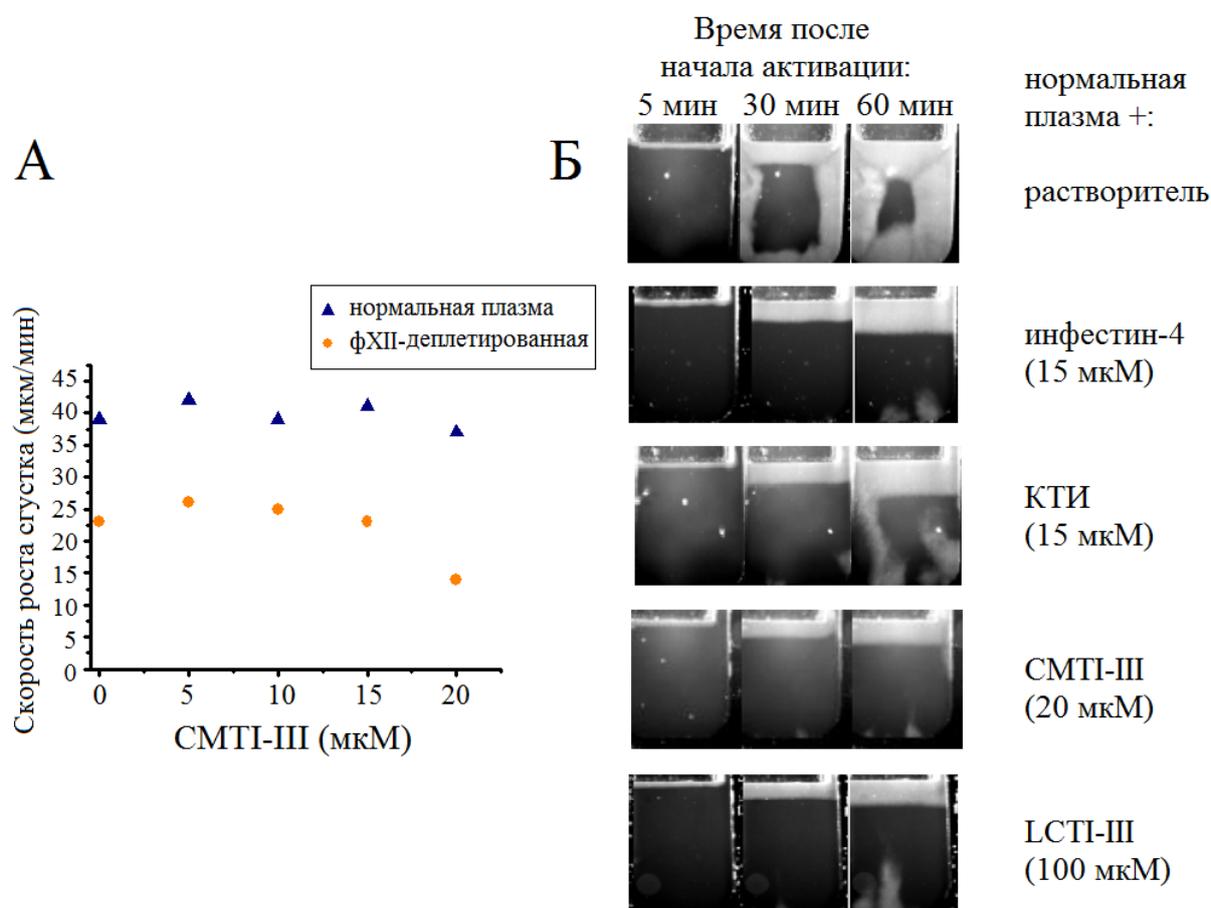


Рисунок 26. Влияние ингибиторов фХIIа на динамику роста фибринового сгустка. (А): Зависимость скорости распространения фибринового сгустка, инициированного ТФ, в нормальной плазме (синие точки) и фХII-деплетированной плазме (оранжевые точки) от концентрации добавленного СМТИ-III. (Б): Фронтальный рост сгустка (светло-серый) в нормальной плазме (темный фон) от поверхности с ТФ (верхний край снимка), а также рост сгустков в объеме плазмы вследствие контактной активации от стенок кюветы. В плазму было добавлено 15 мкМ инфестна-4, 15 мкМ КТИ, 20 мкМ СМТИ-III и 100 мкМ LCТИ-III; в качестве контроля добавлен 30 мМ Нерес рН 7,4 («растворитель»). Показаны типовые фотографии из 4 повторных исследований. Фотографии, полученные методом темного поля, сделаны в моменты времени 5, 30 и 60 мин после активации свертывания поверхностью с ТФ.

При добавлении в нормальную плазму ингибиторов фХIIа: инфестина-4, КТИ, СМТИ-III и LCTI-III, скорость пространственного распространения фибрина от поверхности с ТФ не изменяется (Рисунок 26А; синие точки), но при этом практически полностью предотвращается появление сгустков, возникших вследствие контактной активации (Рисунок 26Б). Чтобы выявить возможную неспецифическую, независимую от фХII, активность ингибиторов, их добавили в плазму, из которой аффинной хроматографией был удален фХII (фХII-деплетированная плазма; Ренам). Оказалось, что СМТИ-III в такой плазме вызывает снижение скорости роста фибринового сгустка от ТФ (Рисунок 26А; оранжевые точки), что говорит об его неспецифическом действии на систему свертывания.

3.2. Внесение мутаций в протеаза-связывающую петлю инфестина-4

3.2.1. Внесенные мутации способствуют стабилизации канонической конформации

Инфестин-4 является самым активным ингибитором фХIIа, однако имеет низкую селективность. Чтобы ее повысить и изучить влияние на селективность инфестина-4 протеаза-связывающей петли, в эту петлю внесены некоторые аминокислотные замены. Для этого сначала проанализированы 89 последовательностей протеаза-связывающей петли ингибиторов, входящих в семейство Казала, к которому относится инфестин-4. Построенная диаграмма Weblogo отражает частоту встречаемости каждого аминокислотного остатка в позициях P² – P^{5'} петли (Рисунок 27А). Эта диаграмма соотнесена с последовательностями петли дикого типа инфестина-4 (FRNYVP) и Мутанта 15 (TRRFVA), который был описан ранее в работе [100] и селективность которого к фХIIа была повышена по сравнению с диким типом. Однако, в указанной работе не было изучено, каким образом замены в петле Мутанта 15 повлияли на структуру ингибитора, каков механизм действия замен на селективность ингибитора и как мутантный вариант инфестина-4 действовал на систему свертывания. Сравнением указанных последовательностей показано, что Phe9 в позиции P² встречается крайне редко в семействе ингибиторов типа Казала (только у инфестина-4 и двух предсказанных белков, дипеталогастина-6 и бразилиензина-8, гомологичных инфестину-4). Значительно чаще эта позиция занята остатком Thr, который может придавать петле каноническую конформацию за счет водородных связей с остатком I1 в позиции P^{1'} [140]. Также сравнение выявило в данном семействе мотив Pro14 и Val15 в позициях P^{4'} и P^{5'}, соответственно. На этом было основано внесение в петлю инфестина-4 замены Phe9 на Thr или Asn, замены Asn11 на Arg, а также замены Tyr12 и Pro14 на Phe и Ala, соответственно. Не производилась замена Arg10 в позиции P¹, потому что этот остаток отвечает за общую

специфичность к трипсин-подобным протеазам. Последовательности петли мутантов инфестина-4 приведены в Таблице 11.

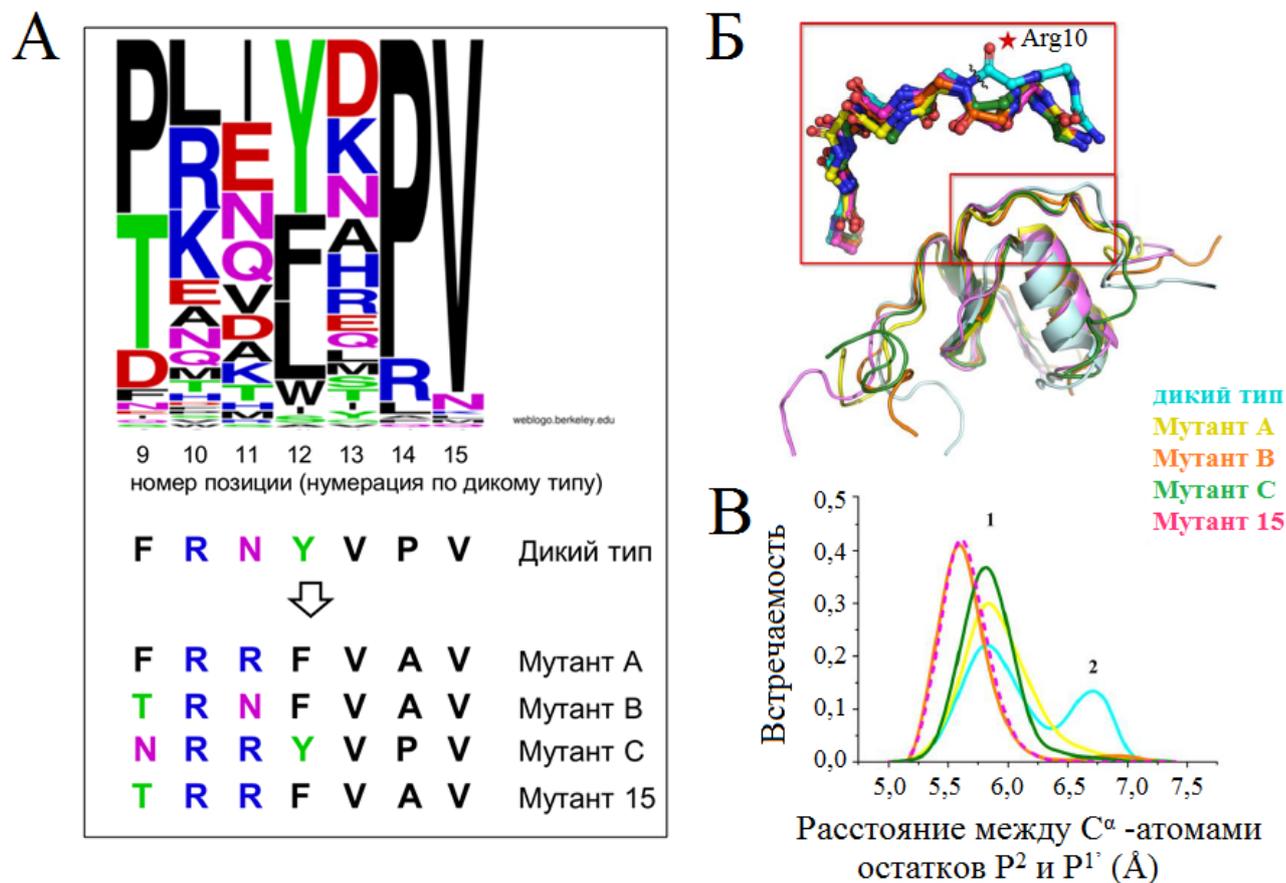


Рисунок 27. Внесение мутаций в протеаза-связывающую петлю инфестина-4 привело к изменению конформации расщепляемой связи. (А): Диаграмма Web-logo встречаемости аминокислотных остатков в позициях петли 89 ингибиторов типа Казалья, нумерация аминокислот по инфестину-4; ниже — список последовательностей мутантов инфестина-4. (Б): Наложение структур, полученных молекулярной динамикой (МД) в течение 150 нс, для дикого типа инфестина-4 и его мутантов. На увеличенном изображении звездочкой отмечен карбонильный атом кислорода остатка Arg10, волнистой линией – расщепляемая связь. (В): Распределение расстояний (Å) между C_{α} атомами остатков P^2 и $P^{1'}$ вариантов инфестина-4 при моделировании молекулярной динамики в течение 150 нс. В канонической конформации вариантов инфестина-4 (пик «1») наиболее вероятным было расстояние 5,6 – 5,8 Å; в неканонической конформации (пик «2») дикого типа наиболее вероятным было расстояние 6,7 Å. Опубликовано в [171].

Молекулярная динамика (МД) вариантов инфестина-4 в течение 150 нс, которая была выполнена в сотрудничестве с Софьей Владимировной Луцкиной (к.х.н., с.н.с. ФГБУН Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук), позволила проанализировать, как данные аминокислотные замены могут влиять на структуру ингибитора. Полученные в ходе МД структуры вариантов инфестина-4 наложены друг на друга, как показано на Рисунке 27Б. Эти структуры по большей части совпадают друг с другом, кроме подвижных

участков на N- и C-концах белков. В области петли вблизи расщепляемой связи P¹ – P^{1'} структуры мутантов также совпадают (Рисунок 27Б; увеличенное изображение в красном прямоугольнике); сравнением со структурами КТИ, LCTI-III и СМТИ-III показано, что структура мутантов является канонической. Каноническая конформация характеризуется достаточно близким, порядка 5,5 – 6,0 Å, расстоянием между C_α атомами остатков P² и P^{1'}. Однако, в ходе МД дикого типа инфестина-4 расстояние между этими остатками может увеличиваться до 6,5 – 7,0 Å (Рисунок 27В), приводя к отклонению петли дикого типа от канонической конформации.

Кроме расстояния между остатками, изучены другие черты канонической конформации петли. Как показано на графиках Рамачандрана, торсионные углы P¹ ψ и P^{1'} φ, задающие вращение пептидной связи, в ходе МД мутантов инфестина-4 и других канонических ингибиторов приобретают строго определенные значения, равные каноническим: 0 ° и -60 °, соответственно (Рисунок 28А; область «1»). Но в петле дикого типа эти углы принимают и неканонические значения 130 ° и -180 °, соответственно. Кроме того, углы χ₁ и χ₂, определяющие вращение боковой группы Arg10, принимают только канонические значения в ходе МД мутантов инфестина-4, в то время как у дикого типа эти углы могут принимать неканонические значения (Рисунок 28Б). Получается, что молекулярнодинамическая структура дикого типа распределяется между канонической (область «1») и неканонической (область «2») конформациями, в то время как у КТИ, LCTI-III, частично СМТИ-III и у мутантов инфестина-4 стабилизируется каноническая конформация. Канонической конформации всех мутантов инфестина-4 может способствовать образование нековалентных связей между остатками P² и P^{1'}; в Мутанте В и Мутанте 15, у которых замена Phe9 на Thr – это стабильные водородные связи, с расстоянием между взаимодействующими атомами 4 Å в течение всего модельного времени, в Мутанте С – менее стабильная водородная связь, а в Мутанте А – π-катионная связь (Рисунок 29А). Напротив, в диком типе не возникает связь между остатками P² и P^{1'}; в ходе МД дикий тип имеет неканоническую конформацию (Рисунок 29Б; фиолетовый цвет), когда возникает π-катионная связь между фенилом Phe9 и гуанидином Arg10 (расстояние 4 – 5 Å).

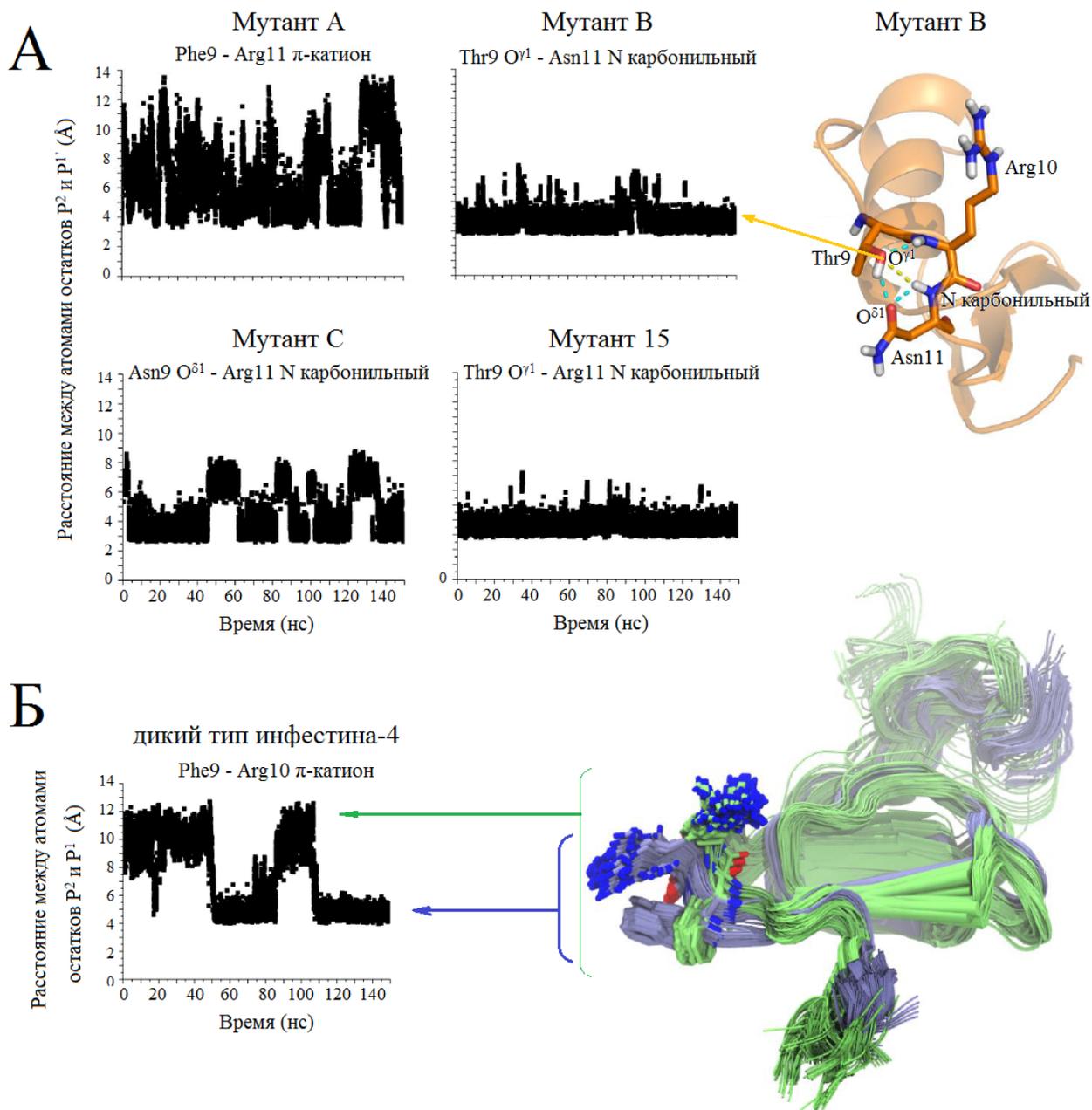


Рисунок 29. Изменение расстояния (Å) между взаимодействующими атомами в петле вариантов инфестина-4 в течение 150 нс МД. (А): Остатки P 2 и P 1 Мутанта В и Мутанта 15 могут образовывать стабильные водородные связи между Thr9 O γ^1 атомом и карбонильным азотом остатка P 1 (расстояние 4 Å между атомами в течение 150 нс). Для Мутанта В эта связь показана желтым пунктиром на вложенной структуре белка. У Мутанта С водородная связь между Asn9 O δ^1 и карбонильным азотом Arg11 менее стабильна, у Мутанта А π -катионная связь между остатками Phe9 и Arg11 образуется, но нестабильна. (Б): У дикого типа инфестина-4 может образоваться (расстояние 4 – 5 Å) и разрушиться (расстояние 8 – 12 Å) π -катионная связь между фенильной группой Phe9 и гуанидиновой группой Arg10. Вложенное изображение – наложение структур, полученных в ходе МД. Кластеризация выделяет два состояния петли – 1) со сближенными остатками Phe9 и Arg10 (фиолетовый цвет, соответствует образованию π -катионной связи) и неканонической конформацией, и 2) с удаленными друг от друга остатками (зеленый цвет) и канонической конформацией.

3.2.2. Мутации повысили селективность инфестина-4 к фактору XIIIa

Для изучения вклада мутаций в петле инфестина-4 на его активность к фXIIIa и селективность относительно других протеаз, мутации внесены в белок-кодирующую последовательность плазмиды pET32-Inf4, а мутантные белки экспрессированы в виде слитых белков с Trx, как это было описано для дикого типа. Выход мутантных белков после очистки составил от 20 до 40 мг с 1 литра культуры. Для всех мутантов определены константы ингибирования протеаз свертывания, а также эффективные концентрации в плазме, при которых время свертывания по контактному пути удлиняется в 3 раза. Мутант В ингибирует фXIIIa с K_i $0,72 \pm 0,17$ нМ; остальные мутанты менее активны (Таблица 11). Несмотря на 6-кратное увеличение K_i по сравнению с диким типом инфестина-4, Мутант В вызывает 3-кратное удлинение АЧТВ при такой же концентрации (19 ± 3 мкМ), как и дикий тип. Эффективные концентрации в плазме для других мутантов оказались выше, в диапазоне 25 – 33 мкМ.

Аналогично дикому типу, мутанты инфестина-4 не ингибируют фXIa, аПС, калликреин и тПА. В отличие от дикого типа, ни один мутант не ингибирует фХа, а их активность к плазмину уменьшена в 500 и более раз по сравнению с диким типом (Таблица 12). Вклад мутаций в активность против других протеаз разнонаправленный. Так, в отличие от дикого типа, Мутант В не ингибирует фVIIa и слабее ингибирует фIXa, однако он на порядок более активен по отношению к тромбину. Мутанты А и С сильнее ингибируют фIXa (K_i 0,32 мкМ и 0,66 мкМ, соответственно), чем дикий тип (K_i 1,06 мкМ); эти мутанты слабо или совсем не ингибируют тромбин. В целом, мутации привели к значительному увеличению селективности; так, селективность Мутанта В составила 4×10^3 .

Таблица 12. Ингибирующая активность инфестина-4 и его мутантов, слитых с тиоредоксином, по отношению к протеазам свертывания

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

«н.и.» – не ингибирует при концентрациях вплоть до 40 мкМ. Опубликовано в [171].

Дополнительно, методом тромбодинамики произведена оценка того, как влияют полученные мутанты инфестина-4 на динамику свертывания. Как видно на Рисунке 30, на котором построены зависимости от времени размера фибринового сгустка, растущего фронтом от поверхности с ТФ, все варианты инфестина в концентрации 20 мкМ ускоряют рост фибринового сгустка в плазме, содержащей нефракционированный гепарин. Этот эффект может быть следствием либо слабой неспецифической активности самих ингибиторов, либо следствием неспецифического влияния на свертывание общих участков этих белков, в частности, Тгх. С другой стороны, в коммерчески доступной плазме пациента с гемофилией В (плазма с дефицитом фИХа; Ренам) только дикий тип инфестина-4 ускорял рост сгустка; все же мутантные формы ингибитора не влияли на динамику свертывания.

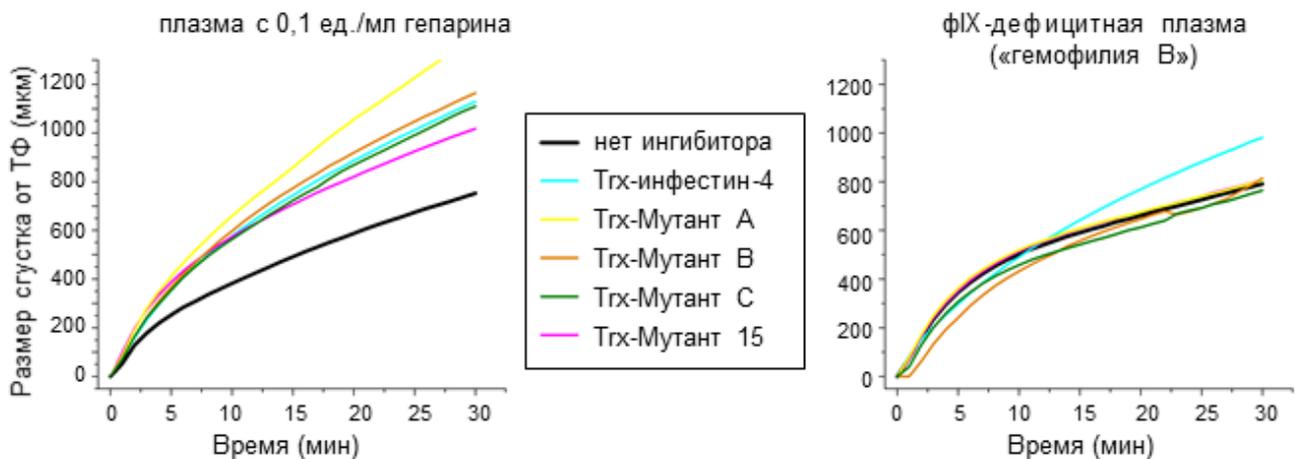


Рисунок 30. Увеличение размера (мкм) фибринового сгустка, растущего от иммобилизованного ТФ, со временем (мин) при добавлении вариантов инфестина-4 (20 мкМ) в плазму, содержащую 0,1 ед./мл нефракционированного гепарина, или в фИХ-дефицитную плазму. «Нет ингибитора» – в плазму добавлено 30 мМ Нерес рН 7,4. Показаны кривые, усредненные по 3 измерениям.

3.3. Механизмы избирательного ингибирования фактора XIIa мутантами инфестина-4

Среди изученных мутантов инфестина-4, Мутант В обладает самой высокой селективностью. Чтобы выяснить механизмы, которые повлияли на увеличение селективности инфестина-4 при внесении мутаций в петлю, поставлена задача проанализировать взаимодействие Мутанта В с фXIIa и фХа. Но предварительно этот ингибитор был отщеплен от Тгх тромбином (Рисунок 31А). После отщепления тромбин был инактивирован необратимым ингибитором РРАСК; отсутствие следовой активности тромбина в препарате Мутанта В подтверждено при помощи хромогенного теста с субстратом Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (Pefachrome ТН 5244; см. Таблицу 10). Как показал анализ активности тромбина в образцах, после инактивации РРАСК уровень тромбина был ниже предела детекции (оценочно, меньше 50 пМ)

(Рисунок 31Б; синяя кривая). После заключительного этапа хроматографической очистки общий выход Мутанта В (13 кДа) составил 25 мг на литр клеточной культуры.

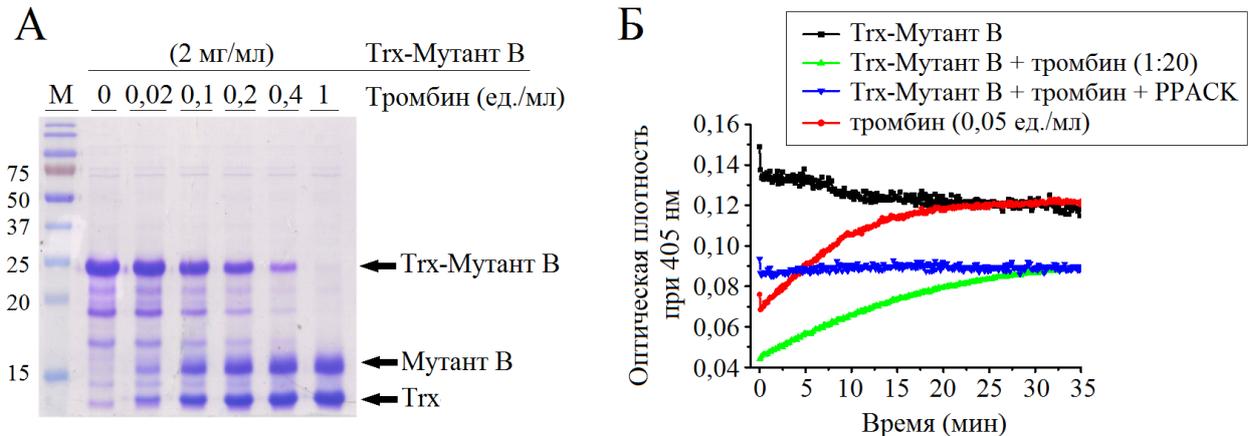


Рисунок 31. Отщепление тромбином тиоредоксина от Мутанта В и ингибирование активности тромбина в реакционной смеси. (А): ПААГ (12,5 %) электрофорез проб с 2 мг/мл Тгх-Мутант В, содержащих указанную концентрацию бычьего тромбина. Слитый белок, содержащий один сайт для тромбина, и продукты его расщепления указаны стрелками. М – маркер молекулярного веса (в кДа); в каждую лунку нанесено по 5 мкл проб реакционной смеси. (Б): Изменение оптической плотности раствора при 405 нм в ходе расщепления хромогенного субстрата тромбином, который содержался в реакционной смеси, разбавленной в 20 раз, через 20 часов после начала реакции отщепления слитого белка (зеленые точки). Также тромбин в концентрации 0,05 ед./мл содержался в положительном контроле на активности тромбина (красные точки). Активность тромбина не регистрировалась в образце до добавления тромбина (черные точки) и после окончания реакции и ингибирования тромбина (синие точки).

Анализ взаимодействий Мутанта В с фХIIа включал изучение структуры комплекса, которые они могут образовывать. В-первых, показано, что этот ингибитор фХIIа является конкурентным. Для дикого типа инфестина-4 это было показано в работе [57]. Для Мутанта В, очищенного от тиоредоксина, был проведен эксперимент, в котором измерялась скорость (V) расщепления различных концентраций субстрата S-2302 (S) фактором ХIIа при добавлении 0; 0,5 или 1 нМ ингибитора. После построения графика в обратных координатах 1/V (1/S) (график Лайнуивера-Берка) и аппроксимации точек прямыми показано, что прямые пересекаются в одной точке на оси ординат, т.е. Мутант В является конкурентным ингибитором фХIIа (Рисунок 32). Исходя из этого предположено, что взаимодействие вариантов инфестина-4 с фХIIа осуществляется через связывание протеаза-связывающей петли с каталитическим карманом протеазы.

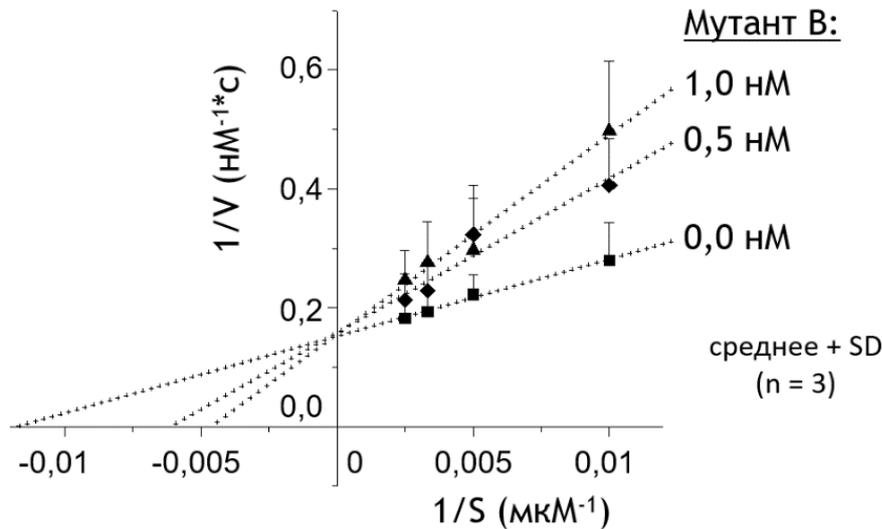


Рисунок 32. График Лайнуивера-Берка для ингибирования фХIIа Мутантом В. Измерялась скорость расщепления субстрата S-2302 (100; 200; 300; 400 мкМ) фактором в присутствии трех концентраций ингибитора (0; 0,5; 1 нМ). Добавление ингибитора увеличивало эффективную константу Михаэлиса, но не изменяло наибольшую скорость фермента. Опубликовано в [171].

Во-вторых, с помощью гибкого белок-белкового докинга получены и проанализированы комплексы всех вариантов инфестина-4 с фХIIа и фХа. Во всех комплексах с фХIIа варианты инфестина-4 располагаются в корректном положении относительно каталитической триады Ser191-His40-Asp89, характерном для канонических ингибиторов. На Рисунке 33А, Б показано, что дикий тип и Мутант В могут образовывать нековалентную связь между P¹ Arg10 и Arg185 S¹ кармана протеазы, а С- и N-атомы расщепляемой пептидной связи в комплексе располагаются вблизи (на расстоянии ~3 Å) от каталитических атомов Ser191 O^γ и His40 N^{ε2}, что может способствовать эффективному прохождению нуклеофильной атаки на связь. Оценочная функция докинга, пропорциональная вычисленной энергии связывания ингибитора с протеазой, соответствует ингибирующей активности вариантов инфестина-4 против фХIIа (Таблица 11); это указывает на то, что ингибирующая активность против фХIIа определяется нековалентными взаимодействиями с фХIIа. Петля дикого типа также корректно располагается в кармане фХа (Рисунок 33В). Напротив, расположение Мутанта В (и других мутантов) отличается наличием «непродуктивных» водородных связей остатков петли с каталитическими остатками Ser195 и His57 фХа (Рисунок 33Г). Предполагается, что связывание с каталитическими остатками может препятствовать нуклеофильной атаке, нарушая стандартный механизм ингибирования, описанный в работе [135], и приводя к уменьшению активности мутантов инфестина-4 против фХа.

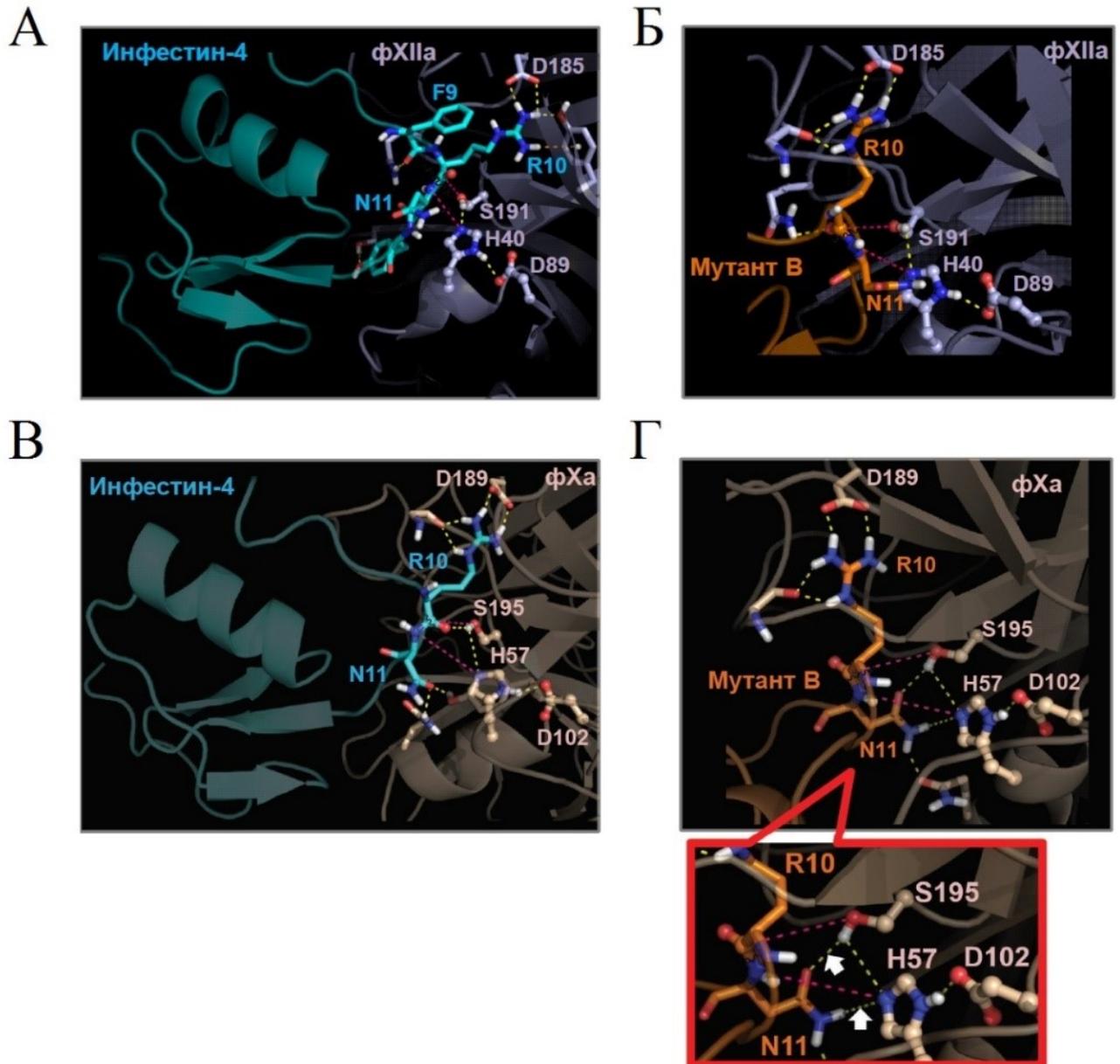


Рисунок 33. Структуры комплексов, полученных белок-белковым докинггом на сервере ClusPro, между протеазой: фХIIа (А, Б; фиолетовый цвет) или фХа (В, Г; светло-коричневый), и ингибитором: диким типом (А, В; бирюзовый цвет) или Мутантом В (Б, Г; оранжевый). В виде палочек показаны каталитические остатки фХIIа и некоторые остатки петли ингибитора; нековалентные связи показаны пунктиром. Обозначения аминокислот однобуквенные. Опубликовано в [171].

Также проанализировано, какой вклад в связывание с ингибиторами могут иметь участки фХIIа, расположенные вне каталитического кармана; примером такого участка является автолитическая петля протеазы. Эта петля располагается вблизи кармана и состоит из 14 – 21 остатков. Сравнение последовательностей автолитической петли протеаз свертывания показало, что данный участок в фХIIа 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) он заряжен положительно (Рисунок 34). Предполагается, что связывание с автолитической петлей фХIIа

положительно заряженных участков ингибиторов, находящихся вне протеаза-связывающей петли, может вносить вклад в избирательность ингибирования фХIIа.

Сериновая протеаза (-фактор свертывания)		Суммарный заряд автолитической петли
Трипсин	GWGNTLSFGAD Y P D EL	- 3
Плазмин	GW G ETQGTFGAGLL	- 1
Активатор фактора роста гепатоцитов	GWGHLDENVSGYSSSL	- 2
ХIIа	GWGHQFEG E E E YASF	- 3
Плазменный калликреин	GWGFS K E K GEIQNIL	0
XIa	GWGY R K L R D KIQNTL	+ 3
IXa	GWGR V F H K G R SALV	+ 3
VIIa	GWGQLL D R GATA L E L	- 1
Xa	GFG R T H E K G R Q S T R L K	+ 4
Тромбин	GWGNL K ETWTANVG K GQPSVL	+ 1
Активированный протеин С	GWGYHSS R E K E A K R N R T F V	+ 3

Отрицательно заряженные аминокислотные остатки

Положительно заряженные аминокислотные остатки

Рисунок 34. Аминокислотные последовательности (однобуквенное обозначение) автолитической петли различных сериновых протеаз и суммарный заряд петли. Анализ последовательности автолитической петли был проведен по следующим белкам (в скобках указан PDB ID): трипсин (1H4W), плазмин (1DDJ), активатор фактора роста гепатоцитов (1YBW), фХIIа (4XE4), плазменный калликреин (2ANW), фXIа (1ZHM), фIXа (3KCG), фVIIа (1DAN), фХа (1P0S), тромбин (4RKO), аПС (3F6U). Прямоугольником выделены все протеазы свертывания, кроме фХIIа. Красным цветом отмечены положительно-заряженные остатки (при нейтральном рН), синим – отрицательно-заряженные.

3.4. Влияние селективных ингибиторов фактора XIIа на динамику свертывания в плазме

3.4.1. Мутант инфестина-4 специфически ингибирует контактный путь свертывания в плазме, свободной от тромбоцитов

Далее изучено влияние полученного селективного ингибитора фХIIа на процесс свертывания в плазме крови. В гомогенной системе, в которой свертывание активируется по контактному пути каолином или по внешнему пути тканевым фактором, исследована кинетика генерации тромбина. После добавления активатора в плазму, содержащую ингибитор фХIIа, происходит наработка активных факторов свертывания и с задержкой по времени образуется тромбин, который расщепляет флуорогенный субстрат. Тромбин достигает максимальной концентрации за время, называемое «время до пика», после чего его концентрация падает до нуля из-за действия плазменных ингибиторов свертывания (например, антитромбина и альфа2-макроглобулина). Когда генерация тромбина активирована тканевым фактором (ТФ, 5 пМ), селективные ингибиторы фХIIа – Мутант В, очищенный от тиоредоксина, и КТИ, не оказывают

влияния на кинетику процесса (Рисунок 35А). Когда генерация активирована по контактному пути каолином, Мутант В и КТИ дозо-зависимо, с эффективными концентрациями около 5 мкМ, задерживают генерацию тромбина и уменьшают его амплитуду (Рисунок 35Б, В).

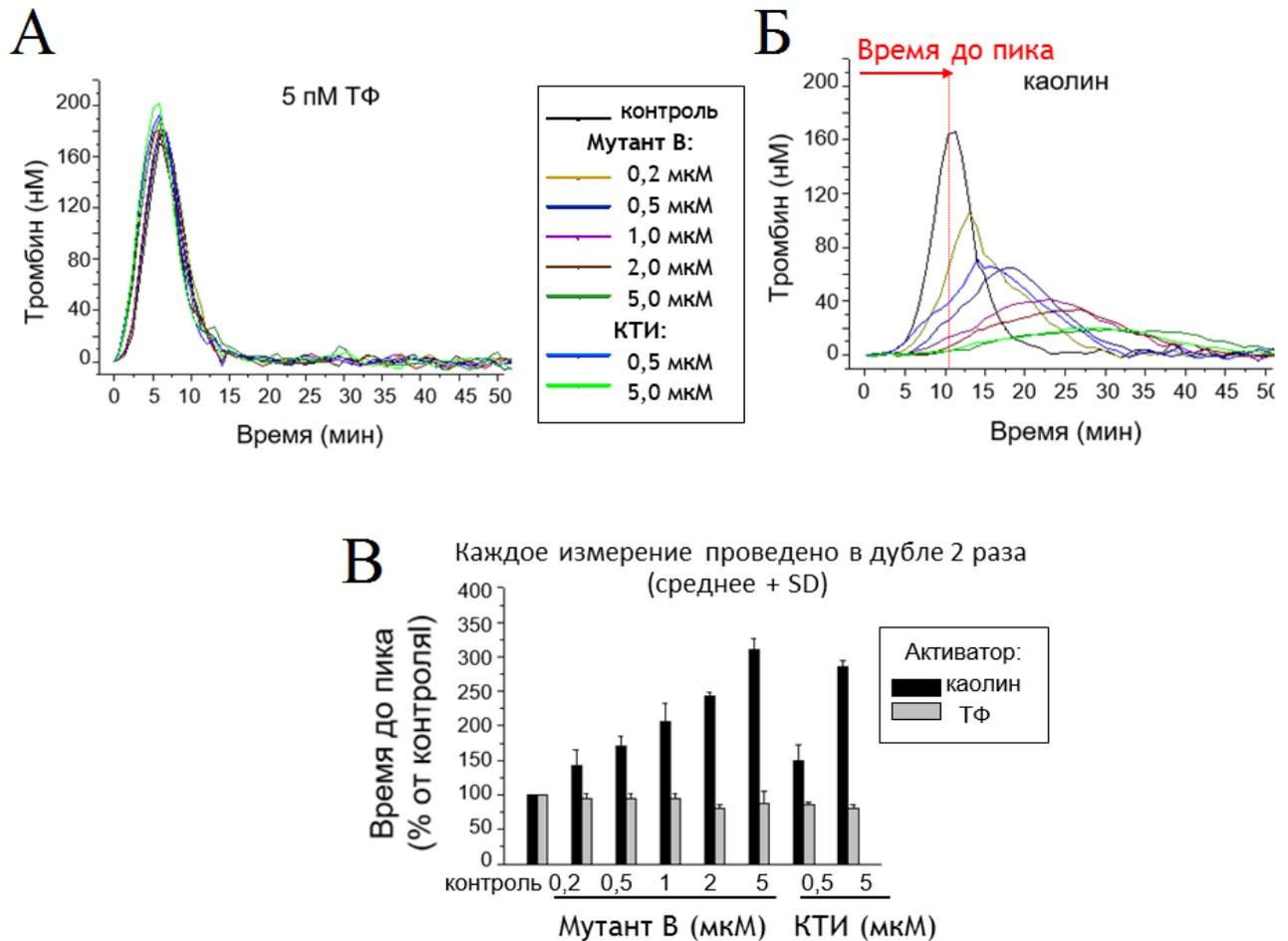


Рисунок 35. Мутант В и КТИ специфически ингибируют генерацию тромбина по контактному пути. **А, Б:** Кривые генерации тромбина в плазме, инкубированной с буфером (контроль) или различными концентрациями ингибиторов, при активации 5 пМ ТФ (**А**) или каолином (**Б**). **В:** Время достижения пика на кривой генерации при двух типах активации и при различных концентрациях ингибиторов. Показано среднее значение + SD по 4 измерениям. Опубликовано в [171].

Аналогичные эффекты получены при исследовании тромбоэластографии. Добавление как Мутанта В, так и КТИ, в нормальную плазму перед началом исследования, в ходе которого активация происходит по контактному пути от стенок аналитической кюветы, приводит к дозо-зависимой задержке образования сгустка (Рисунок 36А). В частности, при добавлении ингибиторов фХIIа увеличивается время начала свертывания, R-время (Рисунок 36Б; темные столбцы). Чтобы оценить специфичность действия ингибиторов на контактный путь, также проведено исследование в плазме без фХII (плазма была иммуно-деплептирована по фХII) при

активации 0,6 пМ ТФ. В такой постановке ингибиторы не оказывают значительного влияния на R-время (Рисунок 36Б; светлые столбцы).

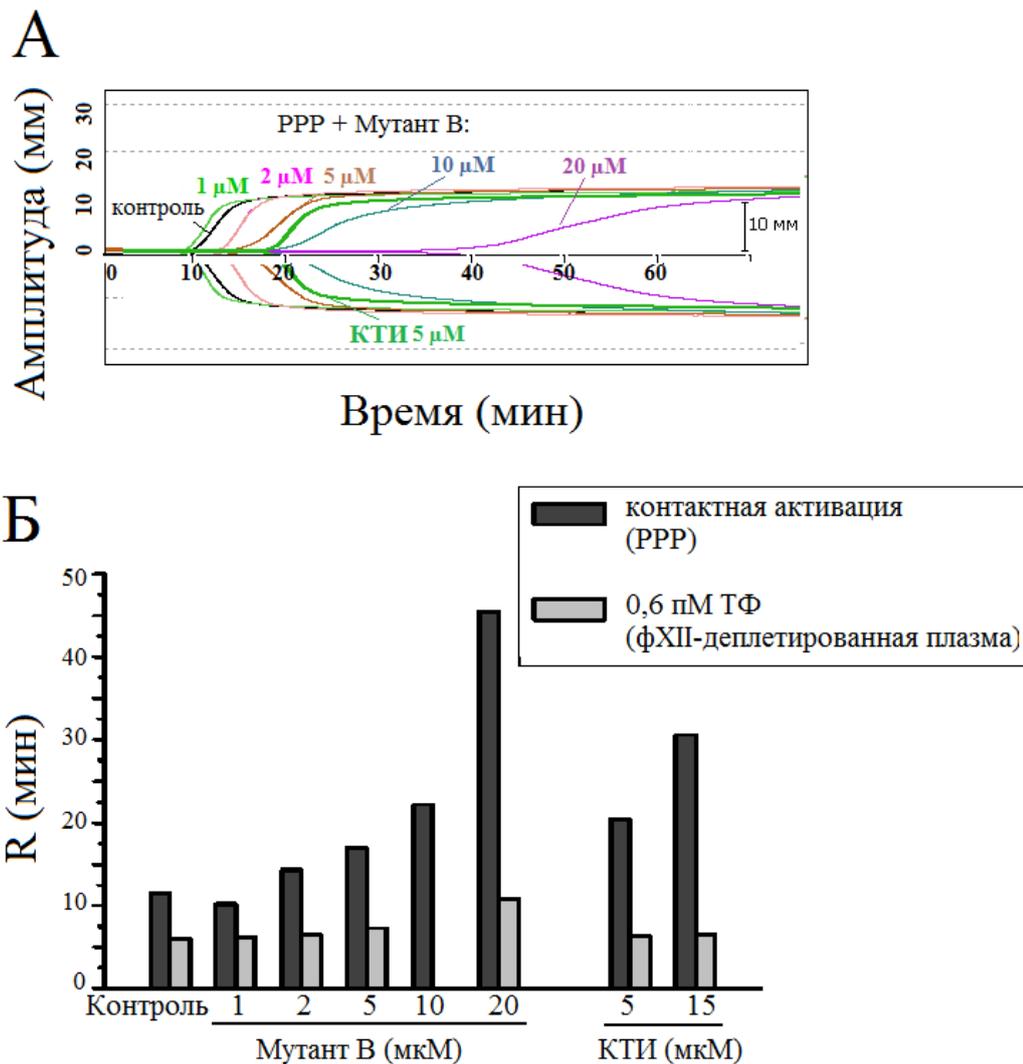


Рисунок 36. Тромбоэластография в плазме с добавлением Мутанта В (1, 2, 5, 10 и 20 мкМ), КТИ (5 и 15 мкМ) или контрольного растворителя. (А): Типовая тромбоэластограмма, представляющая увеличение диаметра сгустка («Амплитуда») в процессе свертывания от стенок кюветы в размороженной плазме, бедной тромбоцитами. (Б): Время задержки начала свертывания («R») при различных концентрациях ингибиторов и при двух типах активации: по контактному пути в нормальной плазме (темные столбцы) или по внешнему пути в фХП-деплептированной плазме (светлые столбцы). Показаны средние значения по 2 измерениям. Опубликовано в [171].

Проведено также исследование пространственного роста сгустка фибрина в плазме, в которую добавлен Мутант В. Если в плазму не добавлен предварительно ни один ингибитор фХПа, тогда за счет контактной активации происходит спонтанный рост ТФ-независимых сгустков вдали от активатора (Рисунок 37А), причем за время порядка 30 мин такие сгустки занимают всю площадь кюветы (Рисунок 37Б). Если в плазму добавлен либо Мутанта В, либо

КТИ, тогда такие ТФ-независимые сгустки не появляются. При этом изученные ингибиторы никак не влияют на динамику фронтального роста сгустка от ТФ в нормальной плазме (Рисунок 37В).

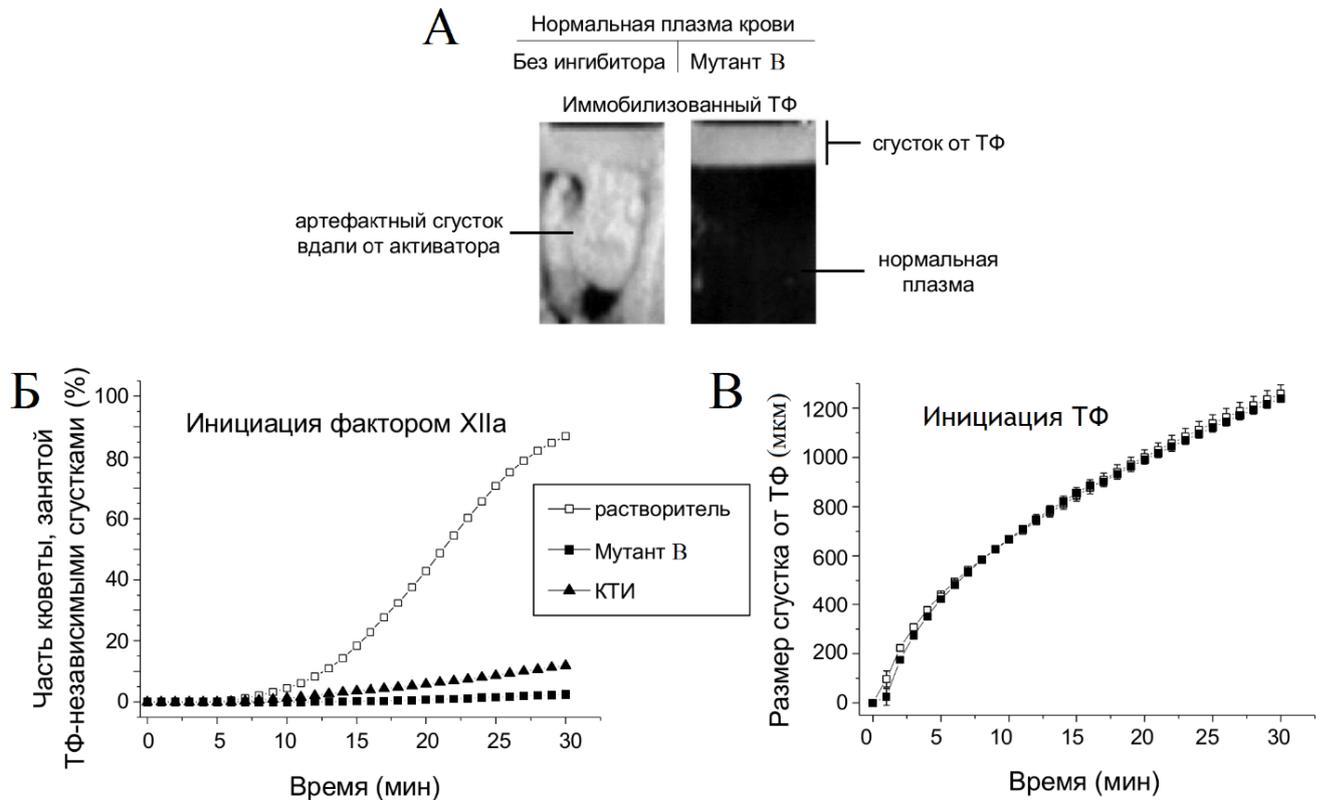


Рисунок 37. Добавление ингибиторов фXIIIa (20 мкМ Мутанта В или 10 мкМ КТИ) в плазму предотвращает появление ТФ-независимых, артефактных сгустков при исследовании тромбодинамики. (А): Изображение кюветы в темном поле, полученное через 30 минут после активации роста фибринового сгустка тканевым фактором (ТФ) на поверхности вставки (верхняя сторона изображения). В отсутствие Мутанта В (слева) также возникали сгустки вследствие контактной активации от стенок кюветы. (Б): График зависимости от времени относительной площади кюветы, занятой ТФ-независимыми сгустками, возникшими из-за контактной активации. В плазму был добавлен либо буферный раствор 30 мМ Нерес рН 7,4 («растворитель»; при этом ТФ-независимые сгустки занимали всю площадь кюветы через 30 минут), либо Мутант В, либо КТИ. Кривые усреднены по 10 измерениям. (В): График зависимости от времени вертикального размера сгустка, растущего от поверхности с ТФ. Кривые усреднены по 3 измерениям. Опубликовано в [171].

Чтобы выявить возможную фXIIIa-независимую активность Мутанта В, изучено его влияние на рост фибринового сгустка в нескольких видах плазмы, для которых характерны различные дефициты свертывания. Так, в фXII-деплетированной плазме Мутант В (20 мкМ) не изменяет динамики роста сгустка (Рисунок 38А); нет эффекта и в плазмах с дефицитом факторов VIII и IX, полученных от пациентов с тяжелой формой гемофилии А и В, соответственно (Рисунок 38Б, В). В нормальной плазме, в которую добавлен нефракционированный гепарин (0,1 ед./мл), Мутант В, взятый в избытке (40 мкМ), также не влиял на рост сгустка от ТФ (Рисунок

38Г); при этом, как было показано ранее, слитый с тиоредоксином ингибитор ускоряет рост сгустка в плазме с гепарином (Рисунок 30), что говорит о некотором воздействии тиоредоксина на систему свертывания. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о специфическом подавлении контактного пути свертывания селективными ингибиторами фХIIа.

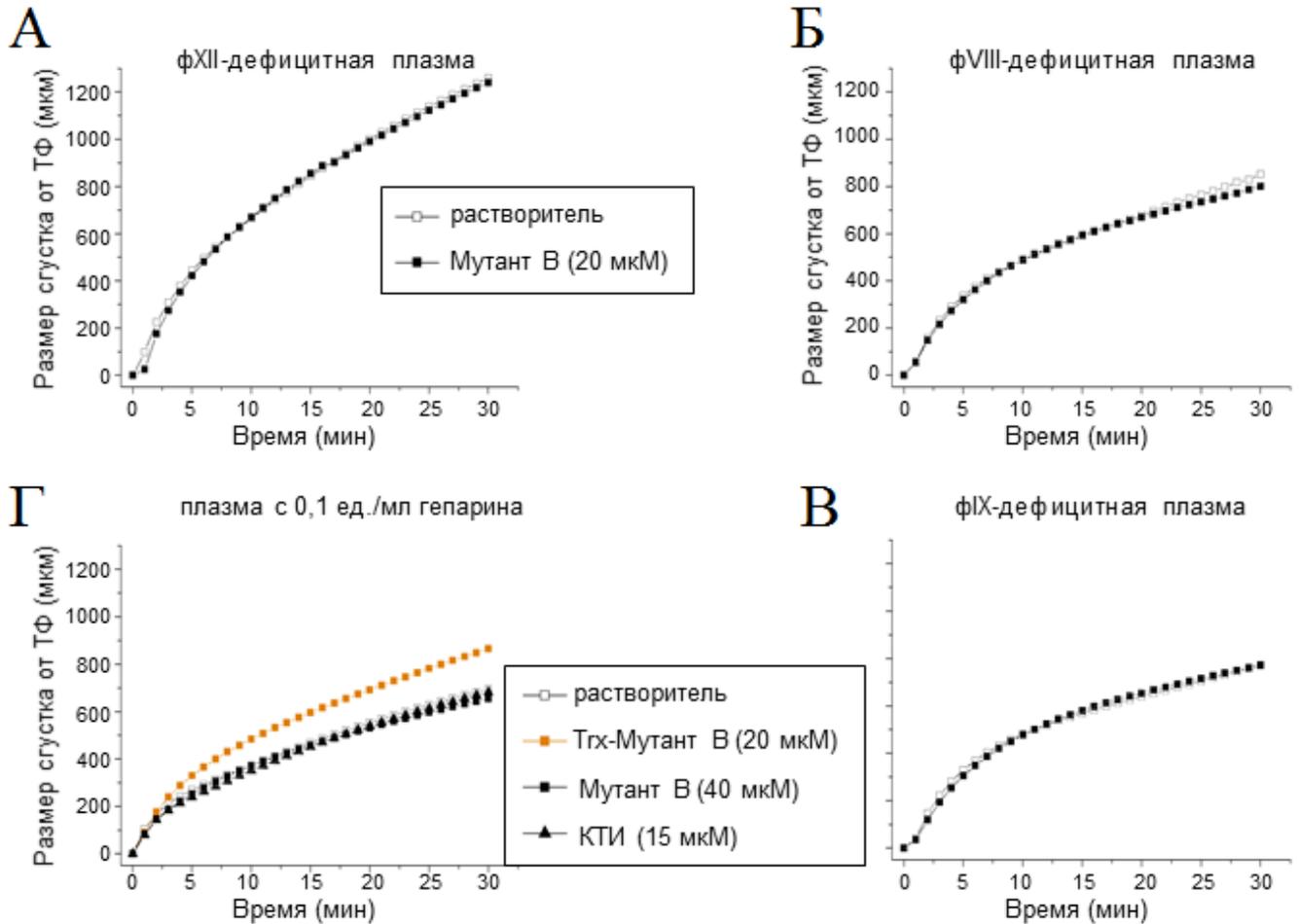


Рисунок 38. Влияние селективных ингибиторов фХIIа, Мутанта В (черные квадраты) и КТИ (черные треугольники), на рост со временем фибринового сгустка, инициированного ТФ, при различных дефицитах системы свертывания: в фХII-деплетированной плазме (А), в плазмах, дефицитных по фVIII (Б) и фIX (В), и в нормальной плазме с добавленным 0,1 ед./мл гепарином (Г). Концентрация Мутанта В в плазмах с дефицитом факторов свертывания составляла 20 мкМ, а в нормальной плазме с гепарином – 40 мкМ; КТИ брали в концентрации 15 мкМ, а слитый с Тгх Мутант В (оранжевые точки) – 20 мкМ. В качестве контроля добавляли 30 мМ Нерес рН 7,4 («растворитель»; пустые квадраты). Кривые усреднены по 4 измерениям.

3.4.2. Возможное научно-практическое применение Мутанта В

После выяснения того, что селективные ингибиторы фХIIа специфически ингибируют только контактную активацию свертывания и не влияют на процесс свертывания, активированный ТФ, были изучены возможные применения таких ингибиторов в качестве реагентов для лабораторной диагностики свертывания и антикоагулянтов для забора и хранения

крови. Чтобы повысить длительность хранения и удобство использования Мутанта В, изучена возможность использования этого ингибитора в лиофильной форме. Как показано на Рисунке 39А, после лиофильной сушки раствора ингибитора его активность, оцененная по удлинению АЧТВ в нормальной плазме, падает незначительно. Кинетика заморозки раствора белка приведена на Рисунке 39Б.

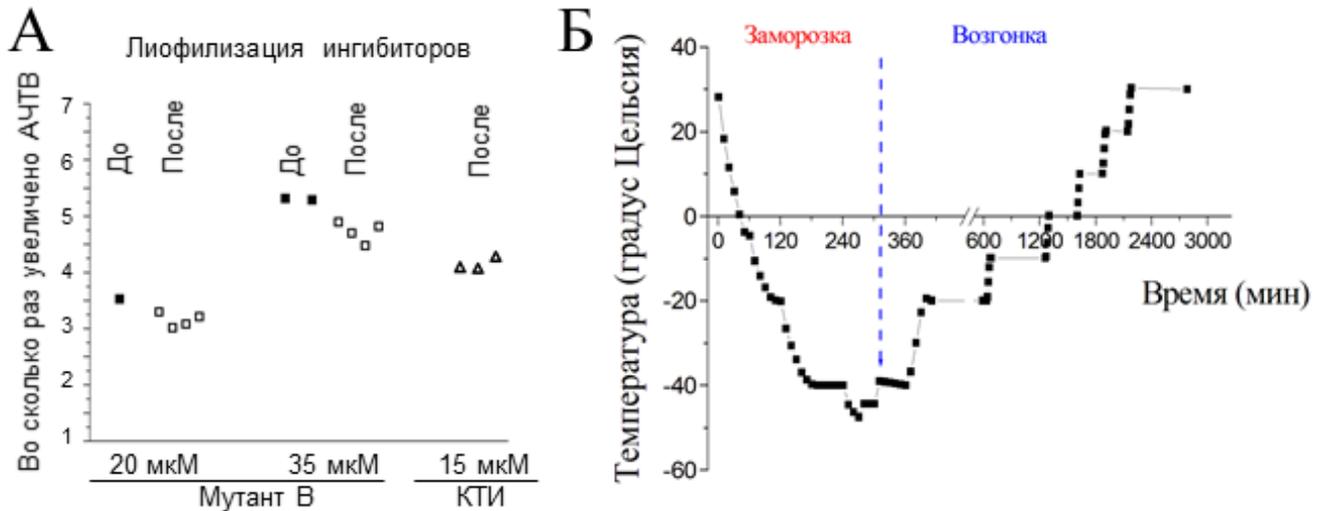


Рисунок 39. Лиофильная сушка раствора Мутанта В. (А): Удлинение АЧТВ при растворении в нормальной плазме препаратов Мутанта В (20 мкМ и 35 мкМ в плазме), взятых до (черные квадраты) и после (полые квадраты) лиофилизации. Для сравнения приведена активность лиофильно высушенного КТИ (концентрация после растворения в плазме 15 мкМ; треугольники). Перед сушкой начальный объем растворов составлял 30 мкл, в раствор был добавлен поливинилпирролидон (1 %). (Б): изменение температуры в ходе процесса лиофилизации. Возгонка замороженного раствора начинается в момент резкого падения давления (отмечен пунктиром).

Полученные в результате лиофилизации препараты белка использованы в методе тромбодинамики в качестве реагента, блокирующего контактную активацию при подготовке образца плазмы и при проведении исследования. Чтобы проверить, насколько метод тромбодинамики позволяет различать различные состояния системы свертывания, использованы три вида плазмы: нормальная плазма без других добавок и нормальная плазма, в которую был добавлен либо 0,1 ед./мл гепарина (модель гипокоагуляции), либо 20 пМ фХIа (модель гиперкоагуляции). Как показано на Рисунке 40, добавление в эти три вида плазмы лиофилизованных ингибиторов фХIа позволяет различать отклонения в системе свертывания от нормального состояния, которое характерно для здоровых доноров. Так, состояние плазмы с гепарином подобно состоянию плазмы пациентов, имеющих повышенный риск обширных кровотечений; плазма с фХIа моделирует протромботическое состояние плазмы пациента.

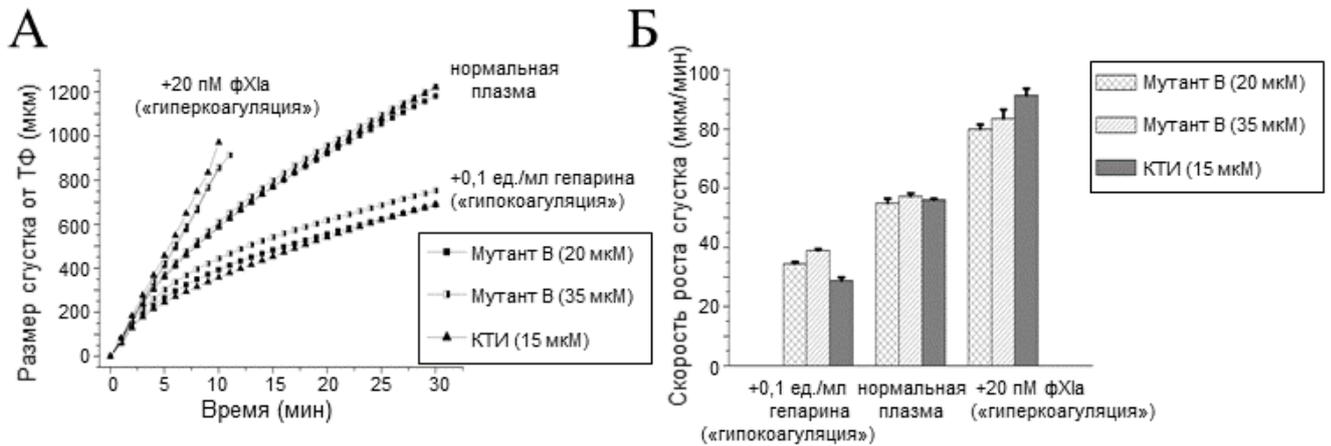


Рисунок 40. Изменение тромбодинамики в зависимости от состояния системы свертывания. Во все виды плазм были добавлены лиофильно высушенные препараты либо Мутанта В, после растворения в плазме его концентрация 20 мкМ (черные квадраты) и 35 мкМ (полупустые квадраты), либо КТИ (15 мкМ). (А): Графики размера фибринового сгустка от времени в нормальной плазме, содержащей ингибитор фХIа, при добавлении в нее гепарина (0,1 ед./мл), фХIа (20 пМ) или без добавления. (Б): Скорость роста сгустка в трех видах плазмы, содержащей Мутант В или КТИ. Результаты представлены в виде среднего по 4 исследованиям.

Кроме того, изучена возможность применения Мутанта В в качестве альтернативного антикоагулянта для забора цельной крови. В цельной крови, которая забиралась без использования цитрата, образование сгустка и изменение вязкости крови регистрируется в отсутствие ингибитора фХIа через $12,4 \pm 1,8$ мин после проведения забора и начала перемешивания крови. Однако, если свежая кровь добавлена в пробирку, в которой находится ингибитор фХIа (10 мкМ Мутанта В или 5 мкМ КТИ), то регистрируемое время свертывания увеличивается, в среднем, до 30 мин ($p < 0,05$; Рисунок 41).

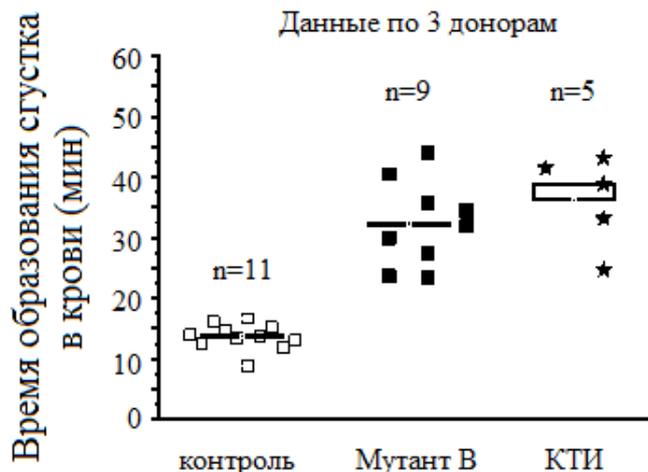


Рисунок 41. Удлинение времени свертывания цельной свежей крови при добавлении Мутанта В. Время свертывания измерялось путем визуального детектирования изменения вязкости крови. Кровь перемешивалась в пробирках либо с контрольным раствором (в крови 30 мМ Нерес рН 7,4; пустые квадраты), либо с Мутантом В (10 мкМ; черные квадраты), либо с КТИ (5 мкМ; звездочки). На диаграмме в каждой группе горизонтальной линией отмечена медиана.

Полученные результаты показывают, что селективные ингибиторы фХIIa могут оказаться полезными для повышения чувствительности диагностических тестов свертывания, как было ранее отмечено в отношении КТИ и теста генерации тромбина в работе [83]. Например, добавление таких ингибиторов при исследовании тромбодинамики позволяет отличить образец плазмы, взятой у пациента с протромботическим состоянием (например, при сепсисе), и образец от здорового донора [88].

3.5. Ингибиторы транглутаминаз регулируют формирование фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов, активирующих контактный путь

Выше описано ингибирование контактной активации в плазме крови с помощью прямых ингибиторов фХIIa, действующих по конкурентному механизму. Дополнительно изучены возможные способы косвенного подавления контактной активации путем ингибирования функции тромбоцитов, на поверхности которых может происходить контактная активация фХIIa. Такие тромбоциты содержат фосфатидилсерин (ФС) и имеют высокую плотность факторов свертывания на внешней стороне мембраны (ФС+ тромбоциты) [64], а их формирование может регулироваться ферментами транглутаминазами [10], которые катализируют образование изо-пептидных сшивок между белками. Предполагается, что ингибирование транглутаминазной активности может влиять на формирование ФС+ тромбоцитов, активирующих контактный путь. Для экспериментальной проверки гипотезы тромбоциты, выделенные из крови здорового донора, стимулировали тромбином или активатором коллагенового рецептора в присутствии ингибиторов транглутаминаз, после чего окрашивали метками, специфически связывающимися с ФС и фибриногеном. С помощью проточной цитофлуориметрии показано, что конкурентные ингибиторы транглутаминаз, цистамин и серотонин, вызвали уменьшение доли ФС+ тромбоцитов при их стимуляции коллаген-подобным пептидом и тромбином, соответственно (Рисунок 42А). Другой ингибитор, ГТФ, молекулы которого «переключают» активность тканевой транглутаминазы в ГТФазную, дозо-зависимо уменьшает долю ФС+ тромбоцитов при их стимуляции конвульксином и тромбином (Рисунок 42Б). Кроме того, Т101, необратимый ингибитор тканевой транглутаминазы (тТГ), предотвращает сшивание этим ферментом молекул фибриногена (Рисунок 43А) и вызывает 2,5-кратное понижение количества фибриногена на ФС+ тромбоцитах, стимулированных коллаген-подобным пептидом (Рисунок 43Б). Полученные результаты о влиянии транглутаминазной активности на формирование ФС+ тромбоцитов и образование их фибриновой/фибриногеновой оболочки в принципе согласуются с недавно опубликованными данными [178].

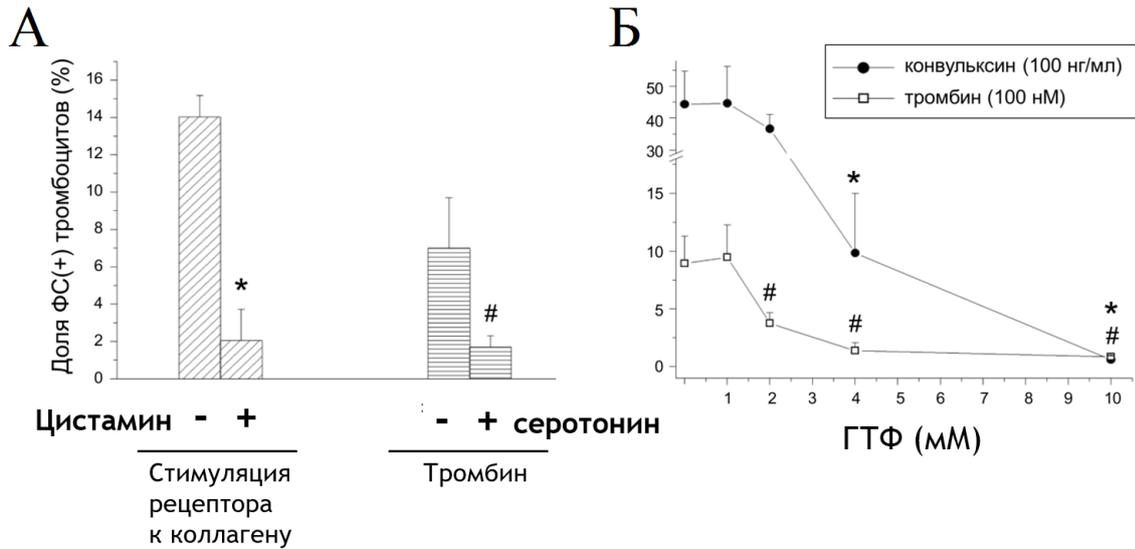


Рисунок 42. Ингибирование трансглутаминазной активности при стимуляции тромбоцитов уменьшает долю ФС+ тромбоцитов. (А): К тромбоцитам, стимулированным коллаген-подобным пептидом (20 мкг/мл) или тромбином (100 нМ), добавляли цистамин (10 мМ) или серотонин (1 мМ). (Б): ГТФ, ингибирующий трансглутаминазную активность тТГ, дозо-зависимо уменьшал долю ФС+ тромбоцитов при их стимуляции конвульксином (100 нг/мл; черные кружки) или тромбином (100 нМ; пустые квадратики). Показаны средние значения + SD для 3 измерений. Достоверность различий определена парным критерием Стьюдента (*, # – уровень значимости $p < 0,05$ для сравнения с контролем в отсутствие ингибиторов). Опубликовано в [179].

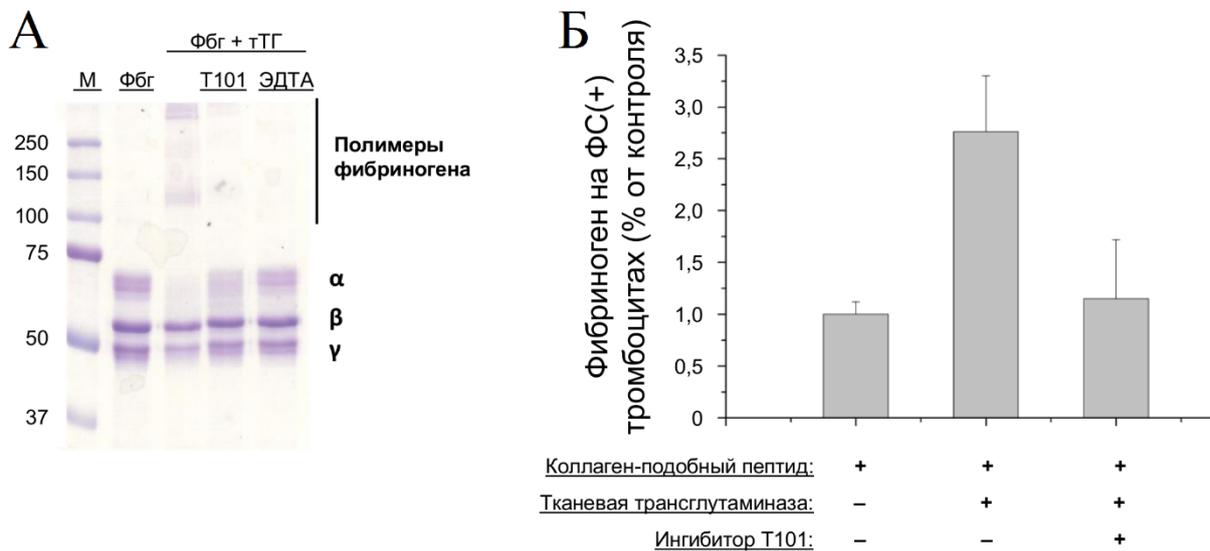


Рисунок 43. Тканевая трансглутаминаза (тТГ) сшивает цепи фибриногена (А) и увеличивает его концентрацию на ФС+ тромбоцитах (Б). (А): Раствор фибриногена (1 мг/мл) содержал кальций-зависимую тТГ (500 нМ) и ее блокаторы: Т101 (200 мкМ) или ЭДТА (25 мМ). Продукты реакции анализировали в 7,5 % ПААГ; фибриноген при этом разделялся на цепи α , β и γ . Активность тТГ оценивалась по образованию ковалентно-сшитых полимеров. (Б): Тромбоциты стимулировали коллаген-подобным пептидом (20 мкг/мл) в присутствии тТГ (500 нМ) и ингибитора Т101 (200 мкМ) и метили аннексином V (связывается с ФС), конъюгированным с R-фикоэритрином, и антителом к фибриногену, конъюгированным с FITC. Флуоресценция антитела к фибриногену на ФС тромбоцитах нормирована на флуоресценцию в отсутствие тТГ. Опубликовано в [180].

Глава 4. Обсуждение

Контактный путь свертывания вызывает тромботические осложнения при использовании устройств экстракорпоральной циркуляции крови [35] и затрудняет манипуляции с кровью *in vitro* [85]. Кроме того, контактная активация на поверхности активированных тромбоцитов способствует развитию индуцированного тромбоза [63]. Парадокс, заключающийся в разной степени вовлеченности контактной активации в процессы тромбоза и гемостаза, подчеркивает огромный недостаток в понимании различий между этими двумя явлениями. Разрешению этого фундаментального парадокса, а также усовершенствованию стратегии антитромботической терапии и повышению качества исследований системы свертывания могут способствовать новые высокоселективные ингибиторы факторов контактной активации [56]. Для создания таких ингибиторов необходимо ясное понимание механизмов избирательного ингибирования контактного пути свертывания, выяснение которых явилось целью настоящей работы. В работе было исследовано, насколько избирательными относительно протеаз системы свертывания являются существующие ингибиторы фХIIа, а также исследовано, каким образом изменяется селективность ингибитора инфестина-4 при внесении мутаций в его протеаза-связывающую петлю и какие взаимодействия могут вносить вклад в повышение селективности. Новые селективные ингибиторы фХIIа на основе мутантов инфестина-4 позволяют исследовать влияние ингибирования контактного пути в плазме крови на динамику свертывания в гомогенной и гетерогенной системах, представленных в тестах генерации тромбина и тромбодинамики, соответственно. Кроме того, в данной работе исследован механизм регуляции прокоагулянтных тромбоцитов, способствующих активации контактного пути в организме.

Для исследования свойств ингибиторов фХIIа созданы системы экспрессии и получены рекомбинантные ингибиторы инфестин-4 и СМТИ-III, слитые с Trx и GB1, соответственно. Чтобы найти наиболее эффективную систему гетерологической экспрессии в *E. coli* малого ингибитора СМТИ-III (29 а.о.), сначала было опробовано несколько различных систем экспрессии. Ранее рекомбинантный СМТИ-III получали в растворенной фракции при экспрессии белка, слитого с GST [115]; в настоящей работе показано, что недостатком такого способа получения СМТИ-III является крайне низкая его активность против фХIIа, которая может быть следствием неактивной конформации экспрессированного белка. Преимущественно, рекомбинантный СМТИ-III получали в нерастворимой фракции телец включения при экспрессии белка, слитого с гидрофобным полипептидом [113, 114]; такой способ получения требует стадий растворения телец включения и рефолдинга, т.е. перевода белка в активную конформацию. В данной работе впервые предпринята попытка получения СМТИ-III в трех бактериальных системах экспрессии:

1) в виде полипептида, содержащего тандемные повторы последовательности СМТИ-III (Рисунок 15, 20); 2) в виде слитого белка с интеиновым элементом и хитин-связывающим доменом (Рисунок 14, 19); 3) в виде слитого белка с His-тагом и доменом В1 протеина G (GB1) (Рисунок 21). Первая экспрессионная система – это вариант системы для экспрессии малых белков в бактериальной клетке, которая была ранее использована для получения рекомбинантного инсулина [175]. Первые две системы экспрессии после отщепления одиночных молекул СМТИ-III приводили к получению восстановленной формы этого белка, которая не содержала дисульфидных мостиков и не обладала ингибирующей активностью. Но третья система экспрессии СМТИ-III оказалась успешной; она позволяет СМТИ-III экспрессироваться в растворимой фракции в активной конформации и позволяет получать около 2 – 4 мг очищенного белка за один этап очистки из 1 литра клеточной культуры, минуя процедуру разрушения трехмерной структуры и последующего рефолдинга. Как было показано ранее, GB1 является белком-партнером, который позволяет получать высокий выход рекомбинантных ингибиторов и при этом не понижает их активность [177]. В случае с получением СМТИ-III, слитого с GB1 и His-тагом на N-конце, такая система экспрессии позволила решить проблемы деградации малого белка в клетках бактерий, синтеза белка в неактивной конформации и/или в нерастворимой форме, малой эффективности связывания белка с сорбентом и низкого выхода целевого белка. В результате решения этих проблем стало возможным изучить ингибирующие свойства СМТИ-III и его влияние на систему свертывания. Оказалось, что СМТИ-III и гомологичный ему LCTI-III, полученный органическим синтезом, ингибируют фХIIа относительно слабо, с константой выше 10 нМ, что согласуется с ранее опубликованными значениями [116]. Кроме того, в настоящей работе впервые показано, что СМТИ-III и LCTI-III неспецифически замедляют рост фибринового сгустка в плазме без фХII (Рисунок 26).

При создании системы экспрессии инфестина-4 изначально был выбран вариант слитого белка с Ttx, который позволил получать инфестин-4 в растворимой фракции бактериальной клетки с выходом, который на порядок выше, чем для СМТИ-III – около 50 мг с литра культуры (Рисунок 23). Ранее, инфестин-4 получали в дрожжевой системе экспрессии, в которой рекомбинантный белок секретировался клетками в питательную среду [47, 98]. В настоящей работе полученный инфестин-4 обладал высокой ингибирующей активностью против фХIIа, причем этот ингибитор оказался наиболее эффективным ингибитором фХIIа среди всех изученных (Таблица 11). Константа ингибирования K_i против фХIIа была равна 0,1 нМ, что полностью совпадает с теми значениями, которые были опубликованы ранее [57, 98]. Константа ингибирования плазмينا инфестином-4, слитым с Ttx, (4,7 нМ) также соответствует опубликованным значениям [57, 98], а константа ингибирования фХа K_i 2 мкМ оказалась более,

чем на порядок, больше, чем в ранее опубликованных работах: K_i 0,05 мкМ для домена инфестина-4 [98] и IC_{50} 0,2 мкМ для инфестина-4, слитого с альбумином [57]. С одной стороны, различия в полученных результатах могут быть связаны с разными белками-партнерами инфестина-4; с другой стороны, разные белки-партнеры не вызвали такого изменения активности против фХIIа. Насколько известно, ранее не проводилось исследование селективности КТИ к фХIIа относительно других протеаз свертывания, хотя этот ингибитор считается высоко избирательным к фХIIа. В данной работе впервые показано, что КТИ из зерен кукурузы слабо ингибирует фХIа (K_i 15 мкМ) и аПС (16 мкМ) и не ингибирует (вплоть до концентрации 30 мкМ) фIХа, фХа, фVIIа, тромбин, плазмин, тПА, плазменный калликреин (Рисунок 25), хотя ранее и предполагалось влияние КТИ систему фибринолиза [84]. Ингибирование фХIа в буферном растворе было позднее подтверждено в исследованиях других авторов [106, 181], однако, также было показано, что этот эффект настолько слабый, что не проявляется в плазме крови [182, 183]. При сравнении селективности инфестина-4 и КТИ оказалось, что инфестин-4 обладает в тысячу раз меньшей селективностью к фХIIа, чем КТИ (40 000).

Чтобы исследовать, какие характеристики инфестина-4 влияют на его селективность к фХIIа, в протеаза-связывающую петлю ингибитора внесены аминокислотные замены. Одной из ключевых замен было внесение остатка Thr в позиции P² вместо Phe. Ранее [100] была произведена такая же замена (Мутант 15) или же замена Phe⁹ на Ser (Мутант 3), который, как и Thr, имеет гидроксильную группу. Однако в указанной работе не было проанализировано, как эти мутации повлияли на структуру инфестина-4 и почему они изменили его селективность. В свою очередь, в настоящей работе показано, что именно Thr часто содержится в позиции P² ингибиторов семейства Казала (Рисунок 27А) и преобладает в этой позиции в ингибиторах из других семейств (Рисунок 12). С помощью моделирования молекулярной динамики инфестина-4 впервые показано для этого белка, что структура дикого типа ингибитора распределена между двумя состояниями: каноническим и неканоническим, причем неканоническая конформация дикого типа может быть вызвана тем, что в его позиции P² содержится нетипичный остаток Phe, который может образовывать неканоническое взаимодействие с остатком в позиции P¹ (Arg) (Рисунок 29Б). Также впервые проведен анализ конформации ингибиторов фХIIа и показано, что созданные мутанты инфестина-4 (Мутант А, Мутант В, Мутант С), а также КТИ и LСТИ-III, которые содержат Pro в позиции P², приобретают, преимущественно, только каноническую конформацию (Рисунок 27Б). Предположительно, канонической конформации расщепляемой связи способствует взаимодействие между остатками в позициях P² и P^{1'} (Рисунок 29А), которое было описано ранее в работе [140]. Примечательно, что для СМТИ-III молекулярная динамика показала наличие неканонической конформации так же, как и для дикого типа инфестина-4.

Исследование ингибирующей активности против фХIIа для мутантов инфестина-4, созданных впервые, показало, что в результате мутаций ингибирующая активность упала от 6 до 100 раз. Наиболее активными среди мутантов оказались Мутант В (K_i 0,7 нМ) и Мутант 15 (K_i 1 нМ), в петле которых может образоваться стабильное взаимодействие между остатками P² и P^{1'}. Причем значения констант ингибирования, измеренные *in vitro*, хорошо согласуются с полученными *in silico* значениями оценочной функции (SF), вычисленной по результатам белок-белкового докинга и пропорциональной расчетной энергии связывания вариантов инфестина-4 с модельной структурой фХIIа (Таблица 11). Ранее [100] была измерена константа ингибирования фХIIа Мутантом 15, равная 3,6 пМ, что примерно в 300 раз ниже значения, полученного в настоящей работе; предполагается, что такая разница может быть обусловлена большими ошибками в измерении малых констант ингибирования, значения которых много меньше концентрации фермента при проведении измерения. Исследование активности вариантов инфестина-4 в плазме против контактного пути с помощью теста АЧТВ показало, что у всех мутантов, кроме Мутанта В, активность в плазме также упала по сравнению с диким типом. Мутант В, как и дикий тип инфестина-4, вызывают трехкратное удлинение АЧТВ при концентрации 20 мкМ. Здесь стоит отметить, что разница между эффективными концентрациями ингибиторов в буферном растворе и плазме крови доходит до 5 порядков величины, т.е. при константе ингибирования 1 нМ или меньше эффективные концентрации в плазме составляют порядка 10 мкМ (Таблица 11). Это может быть объяснено следующим: 1) эффективные концентрации ингибитора в плазме не могут быть меньше концентрации фХIIа, достижимой в ходе контактной активации, при этом наибольшая концентрация фактора составляет 0,3 мкМ; 2) константы ингибирования альфа-фХIIа могут сильно отличаться в тех случаях, когда альфа-фХIIа находится в буферном растворе либо является связанным с поверхностью (каолина), на которой происходит контактная активация.

Мутант В обладает слабой неспецифической активностью против тромбина, однако вплоть до 5 мкМ ингибитора его неспецифическая активность не проявляется, т.к. он не влияет на динамику генерации тромбина в плазме с отсутствующим фХII. Однако, при концентрациях выше 10 мкМ может наблюдаться ингибирование генерации тромбина по пути ТФ. При этом концентрации Мутанта В вплоть до 20 мкМ и выше не оказывают неспецифического действия на динамику образования фибрина и пространственное распространение фронта фибринового сгустка.

Как показало исследование ингибирующей активности против протеаз свертывания, у всех мутантов инфестина-4 исчезла активность против фХа и значительно понизилась активность против плазмина. Такой же эффект был достигнут ранее для Мутанта 3 и Мутанта 15 [100]. В

настоящей работе впервые исследована ингибирующая активность мутантов инфестина-4 ко всем протеазам системы свертывания; это исследование показало, что внесение мутаций привело к уменьшению или исчезновению неспецифической активности инфестина-4 к факторам IXa, VIIa и тромбину. В результате, селективность мутантов оказалась на 2 – 3 порядка выше, чем у дикого типа; повышение селективности проявилось в том, что, в отличие от дикого типа, мутанты инфестина-4 больше не искажали рост фибринового сгустка в плазме с дефицитом фVIII (гемофилия А) или фIX (гемофилия В) (Рисунок 30, 38). Наиболее избирательным к фXIIa оказался Мутант В, значение селективности которого составило 4 000. Также показано экспериментально, что этот мутант ингибирует фXIIa по конкурентному механизму (Рисунок 32). При этом ранее был показан конкурентный механизм ингибирования фXIIa для дикого типа инфестина-4 [57] и для КТИ [95].

Механизм, который может обеспечивать избирательность вариантов инфестина-4 к фXIIa, предложен впервые. В то время, как все варианты инфестина-4 располагаются в каталитическом кармане фXIIa таким образом, что расщепляемая связь может подвергаться нуклеофильной атаке со стороны триады, с фXa мутанты инфестина-4 могут образовывать «непродуктивные» взаимодействия, препятствующие нуклеофильной атаке на расщепляемую связь (Рисунок 33). Предположено, что такие непродуктивные взаимодействия являются причиной падения неспецифической активности против фXa. Ранее были известны примеры того, как при внесении мутаций, стабилизирующих протеаза-связывающую петлю, повышалась селективность канонического ингибитора, но эти примеры ограничиваются только случаями, когда увеличение селективности происходило за счет усиления ингибирования целевой протеазы [146, 150]. Кроме того, впервые для канонических ингибиторов предположено, что избирательность вариантов инфестина-4 и КТИ к фXIIa может быть вызвана взаимодействием вне-петельных участков ингибитора с автолитической петлей фXIIa, заряд которой сильно отличается от заряда для других протеаз свертывания (Рисунок 34). Ранее, избирательное связывание с целевой протеазой за счет взаимодействия с ее автолитической петлей было показано для ингибиторов протеаз свертывания из класса серпинов [152, 184].

Кроме того, впервые было проведено широкое исследование влияния мутанта инфестина-4 с повышенной селективностью к фXIIa на динамику процесса свертывания. Ранее только для дикого типа инфестина-4, слитого с альбумином, было показано, что он специфически ингибирует генерацию тромбина, активированную по контактному пути, не влияя на генерацию при добавлении ТФ [57]. В данной работе тоже показано, что Мутант В специфически ингибирует генерацию тромбина только по контактному пути (Рисунок 35). Причем влияние Мутанта В было дозо-зависимым, что соотносится с обратимым и конкурентным механизмом

ингибирования фХIIа. Впервые показано, что этот вариант инфестина-4 также ингибирует образование фибринового сгустка при исследовании тромбоэластографии (Рисунок 36) и тромбодинамики (Рисунок 37, 38) только в том случае, когда свертывание инициировано по контактному пути. А при активации свертывания ТФ в фХII-дефицитной плазме Мутант В не влияет на динамику свертывания. Дополнительно было показано, что Мутант В является пригодным для практического применения в лабораторной диагностике свертывания. Как КТИ, так и Мутант В слабо теряют свою ингибирующую активность в ходе лиофильной сушки, которая может быть полезна для увеличения срока хранения ингибитора (Рисунок 39), а при их применении для блокирования артефактов контактной активации в тесте тромбодинамики данный тест позволяет различать нормальное состояние системы свертывания от патологических состояний гипокоагуляции (при подавленном гемостазе) и гиперкоагуляции (в протромботическом состоянии) (Рисунок 40). Также эти ингибиторы могут быть использованы в качестве антикоагулянтов для увеличения времени хранения крови в жидком состоянии (Рисунок 41). Обратимое связывание этих ингибиторов с фХIIа может быть преимуществом в том случае, когда требуется удалить ингибитор из плазмы крови перед проведением эксперимента [78]. Ранее было показано только для КТИ, что его применение в тесте по измерению времени свертывания и тесте генерации тромбина способно увеличить чувствительность этих тестов к патологическим состояниям гемостаза [85, 185]. В настоящей работе предположено, что вариант инфестина-4 (Мутант В) является более предпочтительным, чем КТИ, потому что, в отличие от кукурузного ингибитора [163], селективность инфестина-4 и его вариантов может быть модифицирована с помощью аминокислотных замен в протеаза-связывающей петле. Также, вариант инфестин-4 является более предпочтительным ингибитором для проведения фундаментальных исследований и практического применения из-за относительной простоты получения этого ингибитора.

Описанные выше результаты показывают, каким образом можно достичь избирательного ингибирования контактной активации свертывания с помощью прямых ингибиторов фХIIа. При этом такие ингибиторы предотвращают или сильно задерживают свертывание в пробирке, блокируя активный центр протеазы, которая нарабаталась в ходе контактной активации на поверхности пробирки. Иными словами, прямые ингибиторы фХIIа не предотвращают саму контактную активацию (или, по крайней мере, ее начальную стадию), они лишь ингибируют нарабатанный фХIIа и блокируют активацию свертывания через фХI. Можно было бы представить другой способ ингибирования контактной активации – предотвращением самого процесса автоактивации фХII и пре-калликреина на анионной поверхности. Однако, существует огромный недостаток знаний об этом процессе; например, до сих пор непонятно, запускается ли контактная активация из-за того, что одноцепочечная форма фХII при связывании с

поверхностью обретает некоторую активность, или же из-за наличия следовых количеств фХIIа в крови. Поэтому пока не найден приемлемый способ избирательного ингибирования автоактивации факторов контактного пути [186]. С другой стороны, на данный момент известно, что в организме даже в отсутствие чужеродных тел контактная активация может происходить на тромбоцитах, стимулированных коллагеном или тромбином, и приводить к развитию тромбоза [63, 64]. При этом фХII автоактивируется, либо связываясь с молекулами полифосфатов, которые секретируются из плотных гранул тромбоцитов [63], либо связываясь с отрицательно заряженной поверхностью тромбоцитов с фосфатидилсерином (ФС) [64].

И поэтому в данной работе было изучено, каким образом можно регулировать количество таких тромбоцитов, содержащих ФС на внешнем слое мембраны после стимуляции («ФС+ тромбоцитов») и способных активировать контактный путь. Ранее было предположено, что образование ФС+ тромбоцитов происходит с участием двух трансглутаминаз – фХIIа и тканевой трансглутаминазы (тТГ), которые могут концентрировать на поверхности тромбоцитов факторы свертывания, ковалентно сшивая их друг с другом, в частности, через молекулы серотонина [10]. В настоящей работе исследовано, как влияет ингибирование трансглутаминазной активности на формирование ФС+ тромбоцитов. Впервые показано, что ингибирование трансглутаминазной активности избытком субстрата (серотонин) и конкурентным ингибитором (цистамин) или переключение активности тТГ с помощью ГТФ предотвращают появление ФС+ тромбоцитов при их стимуляции (Рисунок 42). В то же время, ингибирование трансглутаминаз необратимым ингибитором (Т101) не изменяет количество ФС+ тромбоцитов при их стимуляции, но предотвращает связывание с ними фибриногена (Рисунок 43). Этот результат был подтвержден в последующем исследовании [178], в котором ингибирование трансглутаминаз необратимыми ингибиторами не влияло на формирование ФС+ тромбоцитов при стимуляции конвульксином и тромбином, но совместное ингибирование как трансглутаминаз, так и интегрин альфа2b-бета3 подавляло связывание фибрина/фибриногена с тромбоцитами. Таким образом, предположено, что, кроме прямого ингибирования фХIIа каноническими ингибиторами, контактную активацию в организме можно регулировать опосредованно, если с помощью ингибиторов трансглутаминаз предотвращать появление тромбоцитов с фосфатидилсерином. На основе результатов, описанных выше, предложена следующая схема, отображающая основные механизмы ингибирования контактной активации свертывания в крови (Рисунок 44). При стимуляции тромбоцит (показан как светлый эллипс) секретирует альфа-гранулы (α) и плотные гранулы (δ), которые содержат как «активаторы» (т.е. прокоагулянтные факторы свертывания, АДФ, кальций, полифосфаты), так и «ингибиторы» (С1-ингибитор, серотонин, ГТФ) образования ФС+ тромбоцитов и контактной активации. В результате трансглутаминазной активности на

поверхности стимулированного тромбоцита может появляться ФС и структура альфа-гранулярных белков («шапка», показана синим цветом), которая, предположительно, участвует в автоактивации фХII. Альфа-фХIIа связан с поверхностью ФС+ тромбоцита и в дальнейшем превращается в растворимый бета-фХIIа. При повышенной активности фХIIа в плазме крови могут активироваться системы свертывания, фибринолиза, комплемента и калликреин-кининовая система, приводя к развитию тромбоза или ангиоэдемы.

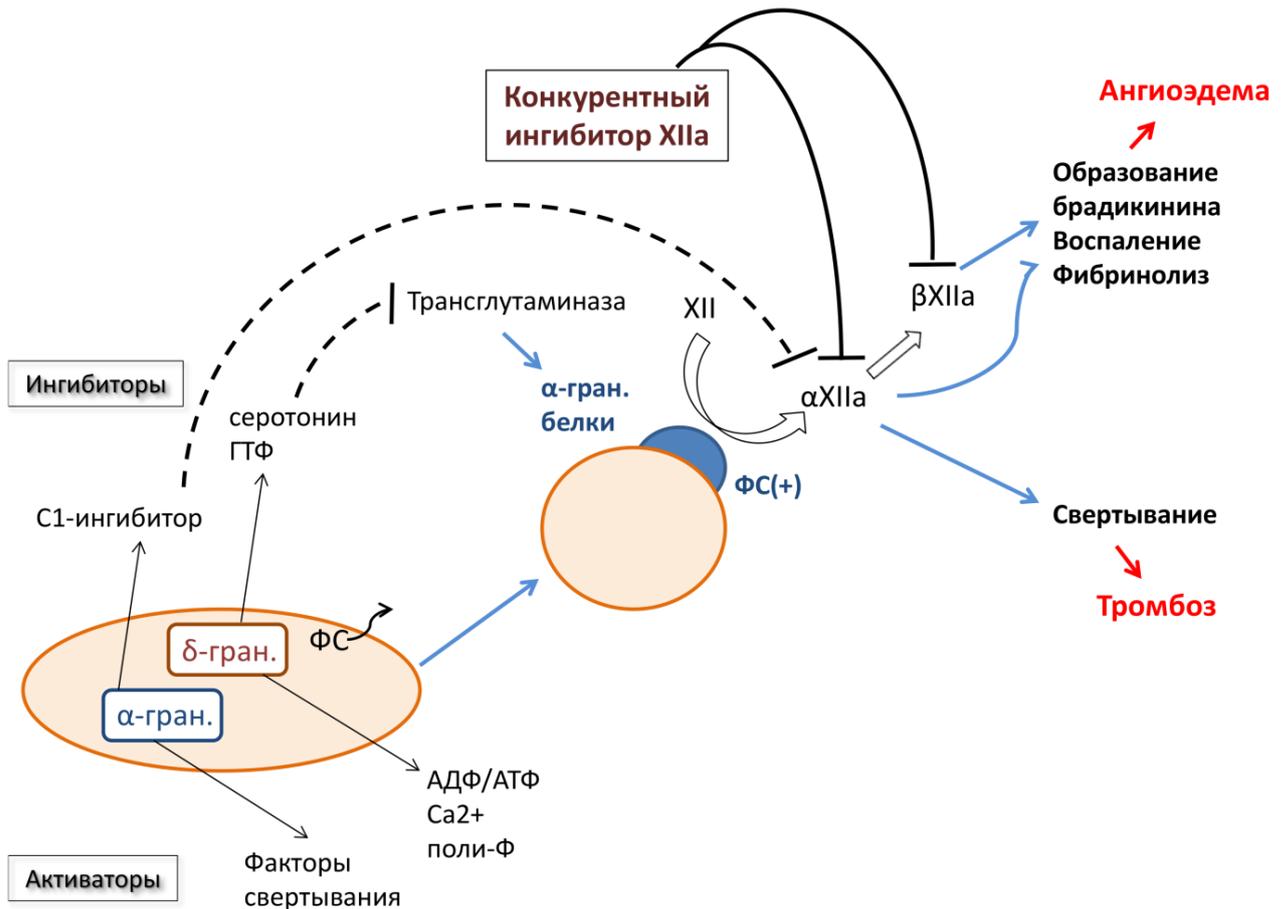


Рисунок 44. Активаторы и ингибиторы контактной активации. При стимуляции на некоторых тромбоцитах под действием трансглутаминаз образуется «шапка» из альфа-гранулярных факторов свертывания и появляется ФС, что способствует образованию альфа-фХIIа. Тромбоциты секретируют АДФ, АТФ и кальций, усиливающие стимуляцию тромбоцита, и полифосфаты («поли-ф»), способствующие контактной активации. Также секретируются ингибиторы трансглутаминаз и С1-ингибитор, действующий на фХIIа.

По сравнению с другими работами, в которых исследовали свойства ингибиторов контактной активации, преимуществом настоящей работы являются: 1) широкое исследование активности ингибиторов фХIIа по отношению ко всем сериновым протеазам, составляющим систему свертывания; 2) широкое исследование влияния этих ингибиторов на систему свертывания, в том числе на время свертывания, активированного по контактному или внешнему

пути, на генерацию тромбина, на образование и пространственное распространение фибринового сгустка. Также преимуществами являются: 3) изучение связи между структурой вариантов ингибитора инфестина-4 и их ингибирующей активностью и 4) определение взаимодействий этого ингибитора с фХIIа, которые могут играть роль в избирательном ингибировании протеазы.

В настоящей работе есть ряд ограничений, которые перечислены ниже. Так, в ней был произведен ограниченный ряд аминокислотных замен, и только в протеаза-связывающей петле инфестина-4. При этом мутации в тех участках молекулы инфестина-4, которые могут взаимодействовать с автолитической петлей фХIIа, а также мутации в этой петле протеазы могут оказаться полезными при дальнейшем изучении механизмов избирательного ингибирования фХIIа. Также ограничением является использование только вычислительных методов для определения взаимодействий между ингибитором и протеазой; здесь не были использованы методы ядерного магнитного резонанса и рентгеноструктурного анализа для определения трехмерной структуры комплексов, образованных ингибитором и протеазой в растворе и в кристалле, соответственно. С фундаментальной точки зрения, ограничением работы является то, что пока не удалось ответить на вопрос, какие мутации надо внести в конкретный белковый ингибитор, чтобы придать ему высокую ингибирующую активность по отношению к выбранной протеазе и при этом избавиться от нежелательного ингибирования других протеаз. Наконец, для полученных селективных ингибиторов фХIIа не было изучено их влияние на развитие сепсиса, ангиоэдемы и тромбоза в экспериментальных моделях на животных, а также не было установлено, как влияет регулирование количества ФС+ тромбоцитов на динамику свертывания в плазме крови.

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. Предложены новые варианты инфестина-4, определена селективность ингибиторов фХIIа и показано, что избирательные ингибиторы фХIIа специфически ингибируют контактную активацию свертывания и не влияют на динамику свертывания по пути тканевого фактора. Высокоселективные ингибиторы фХIIа рекомендуется использовать при хранении крови и исследовании динамики свертывания, активированного тканевым фактором. В перспективе, такие ингибиторы смогут повысить качество забора крови и биосовместимость имплантируемых устройств, увеличить чувствительность диагностических тестов к различным патологиям гемостаза и даже могут стать основой для создания безопасных стратегий лечения и профилактики тромботических состояний. Кроме того, эти ингибиторы могут быть основой для создания новых ингибиторов фХIIа с улучшенными фармакологическими характеристиками. Также в работе показан трансклутаминаза-зависимый механизм, который регулирует формирование тромбоцитов с фосфатидилсеринем, активирующим контактный путь. Предположено, что активность фХIIа в крови может регулироваться как прямыми ингибиторами фХIIа, так и косвенным путем при помощи ингибиторов трансклутаминазной активности. Использование высокоселективных ингибиторов фХIIа в последующих исследованиях может внести вклад в выяснение взаимосвязи между плазменным и тромбоцитарным звеном гемостаза и в понимание физиологической роли фХIIа.

Выводы

1. Инфестин-4 и кукурузный ингибитор трипсина ингибируют фактор XIIa с константами 0,1 и 0,4 нМ, соответственно, и селективностью по отношению к протеазам свертывания 40 и 40×10^3 , 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 фXIIa в 10^2 раз.
3. Мутант В (с заменами Phe9Thr, Tyr12Phe, Pro14Ala) является конкурентным ингибитором фXIIa (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 XIa 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.

Благодарности

Выражаю глубочайшую и сердечную благодарность моему научному руководителю, д.ф.-м.н. Пантелееву Михаилу Александровичу, за безграничные энтузиазм, поддержку и терпение, за плодотворные и очень яркие 9 лет совместной работы. Огромная благодарность моему учителю, д.б.н. Атауллаханову Фазоилу Иноятовичу, за бесценный опыт и знания, за возможность работать в сильной лаборатории с очень дружественным и крепко сплоченным коллективом, а также благодарность всем учителям, которые открыли дверь в науку и задали правильные ориентиры. Выражаю крайнюю признательность д.б.н. Константину Викторовичу Северинову и его сотрудникам, с которыми мне посчастливилось работать, особенно к.б.н. Константину Кузнецову и к.б.н. Леониду Минахину, за любезно предоставленную помощь и поддержку при освоении методик молекулярного клонирования и очистки белков. Искреннюю благодарность выражаю к.х.н. Софье Владимировне Луцкеиной, блестящему специалисту в области компьютерного моделирования белков, за отзывчивость и плодотворное сотрудничество. Также большое спасибо к.б.н. Ивану Ивановичу Воробьеву и к.б.н. Надежде Александровне Орловой за плодотворное сотрудничество и стимулирующие обсуждения. Сердечную признательность выражаю всем моим дорогим друзьям и коллегам, бок о бок с которыми мы продолжаем наш путь, в особенности к.б.н. Татьяне Алексеевне Вуймо, к.б.н. Степану Сергеевичу Сурову и Рузанне Арменовне Овсепян, и исключительную благодарность и признательность – к.б.н. Вере Анатольевне Животовой (Корнеевой), за дружбу, поддержку и помощь во всех устремлениях.

Спасибо моим горячо любимым родителям, брату и дорогой Кате, которым посвящаю свои труды, за веру в мои силы и безусловную поддержку.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

КТИ – кукурузный ингибитор трипсина
СМТИ-III – ингибитор трипсина из тыквы
ЛСТИ-III – ингибитор трипсина из огурца
АДФ – аденозиндифосфат
АТФ – аденозинтрифосфат
ГТФ – гуанозинтрифосфат
ФС – фосфатидилсерин
ТФ – тканевый фактор
фXII – фактор свертывания XII
фXIIa – активированный фактор XII
фXI – фактор свертывания XI
фXIa – активированный фактор XI
фIX – фактор свертывания IX
фIXa – активированный фактор IX
фX – фактор свертывания X
фXa – активированный фактор X
фVII – фактор свертывания VII
фVIIa – активированный фактор VII
фV – фактор свертывания V
фVa – активированный фактор V
фVIII – фактор свертывания VIII
фVIIIa – активированный фактор VIII
ВМКГ – высокомолекулярный кининоген
аПС – активный протеин С
тПА – тканевый активатор плазминогена
уПА – урокиназный активатор плазминогена
РАI-1 – ингибитор активатора плазминогена
ТАFI – ингибитор фибринолиза, активируемый тромбином
EGF – эпидермальный фактор роста
EGFR – рецептор эпидермального фактора роста
цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат
а.о. – аминокислотный остаток
п-К – плазменный пре-калликреин

ПГ – протеогликаны
B2-рец. – брадикининовый рецептор B2
Пл – плазмин
АИК – аппарат искусственного кровообращения
Ab – антитело, ингибирующее фХIIa
инг – прямой ингибитор фХIIa
HGFA – активатор фактора роста гепатоцитов
кДНК – кодирующая ДНК
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК – рибонуклеиновая кислота
Inf-4 – инфестин-4
Dip-6 – дипеталогастин-6
Brs-8 – бразилиензин-8
н.и. – не ингибирует
н.о. – не определена ингибирующая активность
GST – глутатион-S-трансфераза
EcTI – ингибитор трипсина из *Enterolobium contortisiliquum*
ETI – ингибитор трипсина из *Erythrina caffra*
WCI – ингибитор химотрипсина из *Psophocarpus tetragonolobus*
SFTI-I – ингибитор трипсина из подсолнечника
OMSVP3 – овомукоидный третий домен из серебряного фазана
hPSTI – человеческий панкреатический секреторный ингибитор трипсина
BPTI – бычий панкреатический ингибитор трипсина
ALTI – ингибитор трипсина из аскариды человеческой
STCI – соевый ингибитор трипсина и химотрипсина
CI-2 – ингибитор 2 химотрипсина из ячменя
SSI – ингибитор субтилизина из стрептомицетов
PI A-II – ингибитор протеиназ из семян сои Трэйси
dNTP – нуклеозидтрифосфаты
Ni-NTA – никель-нитрилотриуксусная кислота
LB – питательная среда Лурия-Бертани
тТГ – тканевая трансглутаминаза
FITC – флуоресцеин изотиоцианат
CRP – коллаген-подобный пептид
PMSF – фенилметилсульфонилфторид

PPACK – N-D-фенилаланил-пролил-аргинил хлорометилкетон
 DTT – дитиотреитол
 ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
 Tris – трис(гидроксиметил)аминометан
 HEPES – (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
 DMSO – диметилсульфоксид
 ИПТГ – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 п.н. – пара нуклеотидов
 CNBr – цианоген бромид
 MCS – множественный центр клонирования (multiple cloning site)
 CBD – хитин-связывающий домен
 GB1 – B1 домен протеина G из *Streptococcus sp.*
 Trx – тиоредоксин I
 wt-Inf4 – дикий тип инфестина-4
 ПААГ – полиакриламидный гель
 МД – молекулярная динамика
 pNA – p-нитроанилин
 V – начальная скорость гидролиза субстрата
 I – начальная концентрация ингибитора
 IC_{50} – концентрация ингибитора, вызывающее 50 % ингибирование
 S – начальная концентрация субстрата
 K_m – константа Михаэлиса
 ΔIC_{50} – величина SD для IC_{50}
 ΔK_m – величина SD для K_m
 SD – стандартное отклонение
 SE – стандартная ошибка среднего
 K_i – константа ингибирования
 CT_3 – концентрация ингибитора, приводящая к 3-кратному удлинению АЧТВ
 АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время
 ПВ – протромбиновое время
 SF – оценочная функция белок-белкового докинга (scoring function)
 PPP – бедная тромбоцитами плазма (platelet poor plasma)
 PFP – свободная от тромбоцитов плазма (platelet free plasma)
 АМС – 7-амино-4-метил-кумарин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wolberg, A.S. Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited / A.S.Wolberg, M.M.Aleman, K.Leiderman, K.R.Machlus // *Anesth. Analg.* - 2012. - Vol. 114, N 2. - P. 275–285.
2. Sixma, J. The haemostatic plug in haemophilia A: a morphological study of haemostatic plug formation in bleeding time skin wounds of patients with severe haemophilia A / J.Sixma, A. van den Berg // *Br J Haematol.* - 1984. - Vol. 58, N 4. - P. 741–753.
3. Stalker, T.J. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network / T.J.Stalker, E.A.Traxler, J.Wu, K.M.Wannemacher, S.L.Cermignano, R.Voronov, S.L.Diamond, L.F.Brass // *Blood.* - 2013. - Vol. 121, N 10. - P. 1875–1885.
4. Watson, S.P. Platelet activation by extracellular matrix proteins in haemostasis and thrombosis / S.P.Watson // *Curr. Pharm. Des.* - 2009. - Vol. 15, N 12. - P. 1358–1372.
5. Gorudko, I.V. Myeloperoxidase modulates human platelet aggregation via actin cytoskeleton reorganization and store-operated calcium entry / I.V.Gorudko, A.V.Sokolov, E.V.Shamova, N.A.Grudinina, E.S.Drozd, L.M.Shishlo, D.V.Grigorieva, S.B.Bushuk, B.A.Bushuk, S.A.Chizhik, S.N.Cherenkevich, V.B.Vasilyev, O.M.Panasenko // *Biol. Open.* - 2013. - Vol. 2, N 9. - P. 916–923.
6. Mann, K.G. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes / K.G.Mann, M.E.Nesheim, W.R.Church, P.Haley, S.Krishnaswamy // *Blood.* - 1990. - Vol. 76, N 1. - P. 1–16.
7. Cawthorn, K.M. Blood coagulation in hemophilia A and hemophilia C / K.M.Cawthorn, C. van 't Veer, J.B.Lock, M.E.DiLorenzo, R.F.Branda, K.G.Mann // *Blood.* - 1998. - Vol. 91, N 12. - P. 4581–4592.
8. Hoffman, M. A cell-based model of hemostasis / M.Hoffman, D.M.Monroe // *Thromb. Haemost.* - 2001. - Vol. 85, N 6. - P. 958–965.
9. Podoplelova, N.A. Hysteresis-like binding of coagulation factors X/Xa to procoagulant activated platelets and phospholipids results from multistep association and membrane-dependent multimerization / N.A.Podoplelova, A.N.Sveshnikova, J.H.Kurasawa, A.G.Sarafanov, H.Chambost, S.A.Vasil'ev, I.A.Demina, F.I.Ataullakhanov, M.-C.Alessi, M.A.Panteleev // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2016. - Vol. 1858, N 6. - P. 1216–1227.
10. Dale, G.L. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface / G.L.Dale, P.Friese, P.Batar, S.F.Hamilton, G.L.Reed, K.W.Jackson, K.J.Clemetson, L.Alberio // *Nature.* - 2002. - Vol. 415, N 6868. - P. 175–179.

11. Tomaiuolo, M. A systems approach to hemostasis: 2. Computational analysis of molecular transport in the thrombus microenvironment / M.Tomaiuolo, T.J.Stalker, J.D.Welsh, S.L.Diamond, T.Sinno, L.F.Brass // *Blood*. - 2014. - Vol. 124, N 11. - P. 1816–1823.
12. Travis, J. Human plasma proteinase inhibitors / J.Travis, G.S.Salvesen // *Annu. Rev. Biochem.* - 1983. - Vol. 52. - P. 655–709.
13. Dashkevich, N.M. Thrombin activity propagates in space during blood coagulation as an excitation wave / N.M.Dashkevich, M.V.Ovanesov, A.N.Balandina, S.S.Karamzin, P.I.Shestakov, N.P.Soshitova, A.A.Tokarev, M.A.Pantelev, F.I.Ataullakhanov // *Biophys. J.* - 2012. - Vol. 103, N 10. - P. 2233–2240.
14. Pantelev, M.A. Spatial propagation and localization of blood coagulation are regulated by intrinsic and protein C pathways, respectively / M.A.Pantelev, M.V.Ovanesov, D.A.Kireev, A.M.Shibeko, E.I.Sinauridze, N.M.Ananyeva, A.A.Butylin, E.L.Saenko, F.I.Ataullakhanov // *Biophys. J.* - 2006. - Vol. 90, N 5. - P. 1489–1500.
15. БУТЫЛИН, А.А. Пространственная динамика свертывания крови / А.А.БУТЫЛИН, М.А.ПАНТЕЛЕЕВ, Ф.И.АТАУЛЛАХАНОВ // *Российский химический журнал*. - 2007. - Т. LI, Вып. 1. - С. 45–50.
16. Janata, K. Mortality of patients with pulmonary embolism / K.Janata, M.Holzer, H.Domanovits, M.Müllner, A.Bankier, A.Kurtaran, H.C.Bankl, A.N.Laggner // *Wien. Klin. Wochenschr.* - 2002. - Vol. 114, N 17–18. - P. 766–772.
17. Qureshi, A.I. Intracerebral haemorrhage / A.I.Qureshi, A.D.Mendelow, D.F.Hanley // *Lancet*. - 2009. - Vol. 373, N 9675. - P. 1632–1644.
18. Mozaffarian, D. Heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American Heart Association / D.Mozaffarian, E.J.Benjamin, A.S.Go, D.K.Arnett, M.J.Blaha, M.Cushman, S.R.Das, S. de Ferranti, J.-P.Després, H.J.Fullerton, V.J.Howard, M.D.Huffman, C.R.Isasi, M.C.Jiménez, S.E.Judd, B.M.Kissela, J.H.Lichtman, L.D.Lisabeth, S.Liu, R.H.Mackey, D.J.Magid, D.K.McGuire, E.R.Mohler III, C.S.Moy, P.Muntner, M.E.Mussolino, K.Nasir, R.W.Neumar, G.Nichol, L.Palaniappan, D.K.Pandey, M.J.Reeves, C.J.Rodriguez, W.Rosamond, P.D.Sorlie, J.Stein, A.Towfighi, T.N.Turan, S.S.Virani, D.Woo, R.W.Yeh, M.B.Turner // *Circulation*. - 2016. - Vol. 133, N 4. - P. e38-360.
19. Rijken, D.C. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system / D.C.Rijken, H.R.Lijnen // *J. Thromb. Haemost.* - 2009. - Vol. 7, N 1. - P. 4–13.
20. Айсина, Р.Б. Структура и функции системы плазминоген/плазмин / Р.Б.Айсина, Л.И.Мухаметова // *Биоорганическая химия*. - 2014. - Т. 40, Вып. 6. - С. 642–657.
21. Renné, T. In vivo roles of factor XII / T.Renné, A.H.Schmaier, K.F.Nickel, M.Blombäck, C.Maas // *Blood*. - 2012. - Vol. 120, N 22. - P. 4296–4303.

22. Colman, R.W. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes / R.W.Colman, A.H.Schmaier // *Blood*. - 1997. - Vol. 90, N 10. - P. 3819–3843.
23. de Maat, S. Factor XII: form determines function / S. de Maat, C.Maas // *J. Thromb. Haemost.* - 2016. - Vol. 14, N 8. - P. 1498–1506.
24. Terentyeva, V.A. Kinetics and mechanisms of surface-dependent coagulation factor XII activation / V.A.Terentyeva, A.N.Sveshnikova, M.A.Panteleev // *J. Theor. Biol.* - 2015. - Vol. 382. - P. 235–243.
25. Pathak, M. Coagulation factor XII protease domain crystal structure / M.Pathak, P.Wilmann, J.Awford, C.Li, B.K.Hamad, P.M.Fischer, I.Dreveny, L.V.Dekker, J.Emsley // *J. Thromb. Haemost.* - 2015. - Vol. 13, N 4. - P. 580–591.
26. Ichinose, A. The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin / A.Ichinose, K.Fujikawa, T.Suyama // *J. Biol. Chem.* - 1986. - Vol. 261, N 8. - P. 3486–3489.
27. Davis, A.E. Biological activities of C1 inhibitor / A.E.Davis, P.Mejia, F.Lu // *Mol. Immunol.* - 2008. - Vol. 45, N 16. - P. 4057–4063.
28. Ratnoff, O.D. Studies on the inhibition of ellagic acid-activated Hageman factor (factor XII) and Hageman factor fragments / O.D.Ratnoff // *Blood*. - 1981. - Vol. 57, N 1. - P. 55–58.
29. Bäck, J. Distinctive regulation of contact activation by antithrombin and C1-inhibitor on activated platelets and material surfaces / J.Bäck, M.H.Lang, G.Elgue, M.Kalbitz, J.Sanchez, K.Nilsson Ekdahl, B.Nilsson // *Biomaterials*. - 2009. - Vol. 30, N 34. - P. 6573–6580.
30. Ratnoff, O.D. The induction of permeability-increasing activity in human plasma by activated Hageman factor / O.D.Ratnoff, A.A.Miles // *Br. J. Exp. Pathol.* - 1964. - Vol. 45. - P. 328–345.
31. Renné, T. The procoagulant and proinflammatory plasma contact system / T.Renné // *Semin. Immunopathol.* - 2012. - Vol. 34, N 1. - P. 31–41.
32. Schousboe, I. Binding of activated Factor XII to endothelial cells affects its inactivation by the C1-esterase inhibitor / I.Schousboe // *Eur. J. Biochem.* - 2003. - Vol. 270, N 1. - P. 111–118.
33. Schmaier, A.H. The elusive physiologic role of Factor XII / A.H.Schmaier // *J. Clin. Invest.* - 2008. - Vol. 118, N 9. - P. 3006–3009.
34. Björkqvist, J. Defective glycosylation of coagulation factor XII underlies hereditary angioedema type III / J.Björkqvist, S. de Maat, U.Lewandrowski, A.Di Gennaro, C.Oschatz, K.Schönig, M.M.Nöthen, C.Drouet, H.Brale, M.W.Nolte, A.Sickmann, C.Panousis, C.Maas, T.Renné // *J. Clin. Invest.* - 2015. - Vol. 125, N 8. - P. 3132–3146.
35. Mitchell, M.D. Nonpharmacologic interventions for prevention of catheter-related thrombosis: a systematic review / M.D.Mitchell, R.Agarwal, T.E.H.Hecht, C.A.Umscheid // *J. Crit. Care.* - 2013. - Vol. 28, N 3. - P. 316.e9–16.

36. Hsu, L.C. Heparin-coated cardiopulmonary bypass circuits: current status / L.C.Hsu // *Perfusion*. - 2001. - Vol. 16, N 5. - P. 417–428.
37. Gouzy, M. Benzamidine-based coatings: Implication of inhibitor structure on the inhibition of coagulation enzymes in solution and in vitro hemocompatibility assessment / M.Gouzy, C.Sperling, K.Salchert, T.Pompe, C.Rauwolf, C.Werner // *Biointerphases*. - 2006. - Vol. 1, N 4. - P. 146–155.
38. Yau, J.W. Corn trypsin inhibitor coating attenuates the prothrombotic properties of catheters in vitro and in vivo / J.W.Yau, A.R.Stafford, P.Liao, J.C.Fredenburgh, R.Roberts, J.L.Brash, J.I.Weitz // *Acta Biomater*. - 2012. - Vol. 8, N 11. - P. 4092–4100.
39. Stormorken, H. Interrelations between the clotting and kinin systems. Activation of factor VII involving prekallikrein-kallikrein. A review / H.Stormorken, H.Gjoennaess, K.Laake // *Haemostasis*. - 1973. - Vol. 2, N 6. - P. 245–252.
40. Gralnick, H.R. Cold-promoted activation of factor VII and shortening of the prothrombin time / H.R.Gralnick, O.J.Wilson // *Adv. Exp. Med. Biol*. - 1987. - Vol. 214. - P. 113–129.
41. Suontaka, A.M. Occurrence of cold activation of transfusion plasma during storage at +4 degrees C / A.M.Suontaka, A.Silveira, T.Söderström, M.Blombäck // *Vox Sang*. - 2005. - Vol. 88, N 3. - P. 172–180.
42. Konings, J. Factor XIIa regulates the structure of the fibrin clot independently of thrombin generation through direct interaction with fibrin / J.Konings, J.W.P.Govers-Riemslog, H.Philippou, N.J.Mutch, J.I.Borissoff, P.Allan, S.Mohan, G.Tans, H.Ten Cate, R.A.S.Ariëns // *Blood*. - 2011. - Vol. 118, N 14. - P. 3942–3951.
43. Halkier, T. Contact activation of blood coagulation is inhibited by plasma factor XIII b-chain / T.Halkier, S.Magnusson // *Thromb. Res*. - 1988. - Vol. 51, N 3. - P. 313–324.
44. Ratnoff, O.D. A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma / O.D.Ratnoff, J.E.Colopy // *J. Clin. Invest*. - 1955. - Vol. 34, N 4. - P. 602–613.
45. Ratnoff, O.D. The demise of John Hageman / O.D.Ratnoff, R.J.Busse, R.P.Sheon // *N. Engl. J. Med*. - 1968. - Vol. 279, N 14. - P. 760–761.
46. Colman, R.W. Williams trait. Human kininogen deficiency with diminished levels of plasminogen proactivator and prekallikrein associated with abnormalities of the Hageman factor-dependent pathways / R.W.Colman, A.Bagdasarian, R.C.Talamo, C.F.Scott, M.Seavey, J.A.Guimaraes, J.V.Pierce, A.P.Kaplan // *J. Clin. Invest*. - 1975. - Vol. 56, N 6. - P. 1650–1662.
47. Hagedorn, I. Factor XIIa inhibitor recombinant human albumin Infestin-4 abolishes occlusive arterial thrombus formation without affecting bleeding / I.Hagedorn, S.Schmidbauer, I.Pleines, C.Kleinschnitz, U.Kronthaler, G.Stoll, G.Dickneite, B.Nieswandt // *Circulation*. - 2010. - Vol. 121, N 13. - P. 1510–1517.

48. Cheng, Q. A role for factor XIIa-mediated factor XI activation in thrombus formation in vivo / Q.Cheng, E.I.Tucker, M.S.Pine, I.Sisler, A.Matafonov, M.-f.Sun, T.C.White-Adams, S.A.Smith, S.R.Hanson, O.J.T.McCarty, T.Renné, A.Gruber, D.Gailani // *Blood*. - 2010. - Vol. 116, N 19. - P. 3981–3989.
49. Larsson, M. A factor XIIa inhibitory antibody provides thromboprotection in extracorporeal circulation without increasing bleeding risk / M.Larsson, V.Rayzman, M.W.Nolte, K.F.Nickel, J.Björkqvist, A.Jämsä, M.P.Hardy, M.Fries, S.Schmidbauer, P.Hedenqvist, M.Broomé, I.Pragst, G.Dickneite, M.J.Wilson, A.D.Nash, C.Panousis, T.Renné // *Sci. Transl. Med.* - 2014. - Vol. 6, N 222. - P. 222ra17.
50. Kokoye, Y. A comparison of the effects of factor XII deficiency and prekallikrein deficiency on thrombus formation / Y.Kokoye, I.Ivanov, Q.Cheng, A.Matafonov, S.K.Dickeson, S.Mason, D.J.Sexton, T.Renné, K.McCrae, E.P.Feener, D.Gailani // *Thromb. Res.* - 2016. - Vol. 140. - P. 118–124.
51. Renné, T. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII / T.Renné, M.Pozgajová, S.Grüner, K.Schuh, H.-U.Pauer, P.Burfeind, D.Gailani, B.Nieswandt // *J. Exp. Med.* - 2005. - Vol. 202, N 2. - P. 271–281.
52. Kleinschnitz, C. Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis / C.Kleinschnitz, G.Stoll, M.Bendszus, K.Schuh, H.-U.Pauer, P.Burfeind, C.Renné, D.Gailani, B.Nieswandt, T.Renné // *J. Exp. Med.* - 2006. - Vol. 203, N 3. - P. 513–518.
53. Leung, P.Y. Inhibition of factor XII-mediated activation of factor XI provides protection against experimental acute ischemic stroke in mice / P.Y.Leung, S.Hurst, M.A.Berny-Lang, N.G.Verbout, D.Gailani, E.I.Tucker, R.K.Wang, O.J.T.McCarty, A.Gruber // *Transl. Stroke Res.* - 2012. - Vol. 3, N 3. - P. 381–389.
54. Chen, J.W. Selective factor XIIa inhibition attenuates silent brain ischemia: application of molecular imaging targeting coagulation pathway / J.W.Chen, J.-L.Figueiredo, G.R.Wojtkiewicz, C.Siegel, Y.Iwamoto, D.-E.Kim, M.W.Nolte, G.Dickneite, R.Weissleder, M.Nahrendorf // *JACC. Cardiovasc. Imaging*. - 2012. - Vol. 5, N 11. - P. 1127–1138.
55. May, F. FXIIa inhibitor rHA-Infestin-4: safe thromboprotection in experimental venous, arterial and foreign surface-induced thrombosis / F.May, J.Krupka, M.Fries, I.Thielmann, I.Pragst, T.Weimer, C.Panousis, B.Nieswandt, G.Stoll, G.Dickneite, S.Schulte, M.W.Nolte // *Br. J. Haematol.* - 2016. - Vol. 173, N 5. - P. 769–778.
56. Revenko, A.S. Selective depletion of plasma prekallikrein or coagulation factor XII inhibits thrombosis in mice without increased risk of bleeding / A.S.Revenko, D.Gao, J.R.Crosby,

- G.Bhattacharjee, C.Zhao, C.May, D.Gailani, B.P.Monia, A.R.MacLeod // *Blood*. - 2011. - Vol. 118, N 19. - P. 5302–5311.
57. Xu, Y. Factor XIIa inhibition by Infestin-4: in vitro mode of action and in vivo antithrombotic benefit / Y.Xu, T.-Q.Cai, G.Castriota, Y.Zhou, L.Hoos, N.Jochnowitz, C.Loewrigkeit, J.A.Cook, A.Wickham, J.M.Metzger, M.L.Ogletree, D.A.Seiffert, Z.Chen // *Thromb. Haemost.* - 2014. - Vol. 111, N 4. - P. 694–704.
58. Cai, T.-Q. Factor XII full and partial null in rat confers robust antithrombotic efficacy with no bleeding / T.-Q.Cai, W.Wu, M.K.Shin, Y.Xu, N.Jochnowitz, Y.Zhou, L.Hoos, R.Bentley, W.Strapps, A.Thankappan, J.M.Metzger, M.L.Ogletree, M.Tadin-Strapps, D.A.Seiffert, Z.Chen // *Blood Coagul. Fibrinolysis*. - 2015. - Vol. 26, N 8. - P. 893–902.
59. Krupka, J. The coagulation factor XIIa inhibitor rHA-Infestin-4 improves outcome after cerebral ischemia/reperfusion injury in rats / J.Krupka, F.May, T.Weimer, I.Pragst, C.Kleinschnitz, G.Stoll, C.Panousis, G.Dickneite, M.W.Nolte // *PLoS One*. - 2016. - Vol. 11, N 1. - P. e0146783.
60. Yau, J.W. Selective depletion of factor XI or factor XII with antisense oligonucleotides attenuates catheter thrombosis in rabbits / J.W.Yau, P.Liao, J.C.Fredenburgh, A.R.Stafford, A.S.Revenko, B.P.Monia, J.I.Weitz // *Blood*. - 2014. - Vol. 123, N 13. - P. 2102–2107.
61. Matafonov, A. Factor XII inhibition reduces thrombus formation in a primate thrombosis model / A.Matafonov, P.Y.Leung, A.E.Gailani, S.L.Grach, C.Puy, Q.Cheng, M.-f.Sun, O.J.T.McCarty, E.I.Tucker, H.Kataoka, T.Renné, J.H.Morrissey, A.Gruber, D.Gailani // *Blood*. - 2014. - Vol. 123, N 11. - P. 1739–1746.
62. Labberton, L. New agents for thromboprotection. A role for factor XII and XIIa inhibition / L.Labberton, E.Kenne, T.Renné // *Hämostaseologie*. - 2015. - Vol. 35, N 4. - P. 338–350.
63. Smith, S.A. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis / S.A.Smith, N.J.Mutch, D.Baskar, P.Rohloff, R.Docampo, J.H.Morrissey // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2006. - Vol. 103, N 4. - P. 903–908.
64. Zakharova, N.V. Platelet surface-associated activation and secretion-mediated inhibition of coagulation factor XII / N.V.Zakharova, E.O.Artemenko, N.A.Podoplelova, A.N.Sveshnikova, I.A.Demina, F.I.Ataullakhanov, M.A.Pantelev // *PLoS One*. - 2015. - Vol. 10, N 2. - P. e0116665.
65. Doolittle, R.F. Step-by-step evolution of vertebrate blood coagulation / R.F.Doolittle // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* - 2009. - Vol. 74. - P. 35–40.
66. Robinson, A.J. Hageman factor (factor XII) deficiency in marine mammals / A.J.Robinson, M.Kropatkin, P.M.Aggeler // *Science*. - 1969. - Vol. 166, N 3911. - P. 1420–1422.
67. Parunov, L.A. Epidemiology of venous thromboembolism (VTE) associated with pregnancy / L.A.Parunov, N.P.Soshitova, M.V.Ovanesov, M.A.Pantelev, I.I.Serebriyskiy // *Birth Defects Res. C. Embryo Today*. - 2015. - Vol. 105, N 3. - P. 167–184.

68. Palareti, G. Bleeding with anticoagulant treatments / G.Palareti // *Hamostaseologie*. - 2011. - Vol. 31, N 4. - P. 237–242.
69. Mittal, M.K. Anticoagulation-related intracranial hemorrhages / M.K.Mittal, A.A.Rabinstein // *Curr. Atheroscler. Rep.* - 2012. - Vol. 14, N 4. - P. 351–359.
70. Schousboe, I. Pharmacological regulation of factor XII activation may be a new target to control pathological coagulation / I.Schousboe // *Biochem. Pharmacol.* - 2008. - Vol. 75, N 5. - P. 1007–1013.
71. Vakhrusheva, T.V. Albumin reduces thrombogenic potential of single-walled carbon nanotubes / T.V.Vakhrusheva, A.A.Gusev, S.A.Gusev, I.I.Vlasova // *Toxicol. Lett.* - 2013. - Vol. 221, N 2. - P. 137–145.
72. Maevsky, E. Clinical results of Perftoran application: present and future / E.Maevsky // *Artif. Cells. Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* - 2005. - Vol. 33, N 1. - P. 37–46.
73. Маевский, Е.И. Возможные причины острой реактогенности эмульсии перфторуглеродов. Часть 1. Перфторан / Е.И.Маевский // *Известия Института инженерной физики*. - 2016. - Т. 1, Вып. 39. - С. 79–87.
74. Streller, U. Design and evaluation of novel blood incubation systems for in vitro hemocompatibility assessment of planar solid surfaces / U.Streller, C.Sperling, J.Hübner, R.Hanke, C.Werner // *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* - 2003. - Vol. 66, N 1. - P. 379–390.
75. Sperling, C. Blood coagulation on biomaterials requires the combination of distinct activation processes / C.Sperling, M.Fischer, M.F.Maitz, C.Werner // *Biomaterials*. - 2009. - Vol. 30, N 27. - P. 4447–4456.
76. Полетаев, А.В. Применение глобальных тестов гемостаза для мониторинга эффективности низкомолекулярных гепаринов / А.В.Полетаев, А.Н.Баландина, С.Е.Работинский, Ф.И.Атауллаханов, Е.М.Шулутко // *Вестник последипломного медицинского образования*. - 2013. - Вып. 3. - С. 45.
77. Nair, S.C. Tests of global haemostasis and their applications in bleeding disorders / S.C.Nair, Y.Dargaud, M.Chitlur, A.Srivastava // *Haemophilia*. - 2010. - Vol. 16, S. 5. - P. 85–92.
78. Panteleev, M.A. Global/integral assays in hemostasis diagnostics: promises, successes, problems and prospects / M.A.Panteleev, H.C.Hemker // *Thromb. J.* - 2015. - Vol. 13, N 1. - P. 5.
79. Dashkevich, N.M. Effect of pre-analytical conditions on the thrombodynamics assay / N.M.Dashkevich, T.A.Vuimo, R.A.Ovsepyan, S.S.Surov, N.P.Soshitova, M.A.Panteleev, F.I.Ataullakhanov, C.Negrier // *Thromb. Res.* - 2014. - Vol. 133, N 3. - P. 472–476.
80. Шибeko, А.М. Роль пространственно-временной неоднородности в регуляции свертывания крови / А.М.Шибeko, Ф.И.Атауллаханов // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. - 2013. - Т. 99, Вып. 1. - С. 33–43.

81. Атауллаханов, Ф.И. Почему дефициты факторов внутреннего пути свертывания приводят к гемофилии / Ф.И.Атауллаханов, А.И.Воробьев, А.А.Бутылин, Е.И.Синауридзе, М.В.Ованесов // Проблемы гематологии и переливания крови. - 2003. - Вып. 1. - С. 7–13.
82. Parunov, L.A. Improvement of spatial fibrin formation by the anti-TFPI aptamer BAX499: changing clot size by targeting extrinsic pathway initiation / L.A.Parunov, O.A.Fadeeva, A.N.Balandina, N.P.Soshitova, K.G.Kopylov, M.A.Kumskova, J.C.Gilbert, R.G.Schaub, K.E.McGinness, F.I.Ataullakhanov, M.A.Pantelev // J. Thromb. Haemost. - 2011. - Vol. 9, N 9. - P. 1825–1834.
83. Luddington, R. Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition / R.Luddington, T.Baglin // J. Thromb. Haemost. - 2004. - Vol. 2, N 11. - P. 1954–1959.
84. Nielsen, V.G. Corn trypsin inhibitor decreases tissue-type plasminogen activator-mediated fibrinolysis of human plasma / V.G.Nielsen // Blood Coagul. Fibrinolysis. - 2009. - Vol. 20, N 3. - P. 191–196.
85. Spronk, H.M.H. Monitoring thrombin generation: Is addition of corn trypsin inhibitor needed? / H.M.H.Spronk, A.W.J.H.Dielis, M.Panova-Noeva, R. van Oerle, J.W.P.Govers-Riemslog, K.Hamulyák, A.Falanga, H.Ten Cate // Thromb. Haemost. - 2009. - Vol. 101, N 6. - P. 1156–1162.
86. Collins, P.W. Global tests of haemostasis in critically ill patients with severe sepsis syndrome compared to controls / P.W.Collins, L.I.Macchiavello, S.J.Lewis, N.J.Macartney, A.G.Saayman, R.Luddington, T.Baglin, G.P.Findlay // Br. J. Haematol. - 2006. - Vol. 135, N 2. - P. 220–227.
87. Lipets, E. Circulating contact-pathway-activating microparticles together with factors IXa and XIa induce spontaneous clotting in plasma of hematology and cardiologic patients / E.Lipets, O.Vlasova, E.Urnova, O.Margolin, A.Soloveva, O.Ostapushchenko, J.Andersen, F.Ataullakhanov, M.Pantelev // PLoS One. - 2014. - Vol. 9, N 1. - P. e87692.
88. Soshitova, N.P. Predicting prothrombotic tendencies in sepsis using spatial clot growth dynamics / N.P.Soshitova, S.S.Karamzin, A.N.Balandina, O.A.Fadeeva, A.V.Kretchetova, G.M.Galstian, M.A.Pantelev, F.I.Ataullakhanov // Blood Coagul. Fibrinolysis. - 2012. - Vol. 23, N 6. - P. 498–507.
89. Mann, K.G. Citrate anticoagulation and the dynamics of thrombin generation / K.G.Mann, M.F.Whelihan, S.Butenas, T.Orfeo // J. Thromb. Haemost. - 2007. - Vol. 5, N 10. - P. 2055–2061.
90. Nossel, H.L. Inhibition of Hageman factor activation / H.L.Nossel, H.Rubin, M.Drillings, R.Hsieh // J. Clin. Invest. - 1968. - Vol. 47, N 5. - P. 1172–1180.
91. Ulmer, J.S. Ecotin is a potent inhibitor of the contact system proteases factor XIIa and plasma kallikrein / J.S.Ulmer, R.N.Lindquist, M.S.Dennis, R.A.Lazarus // FEBS Lett. - 1995. - Vol. 365, N 2–3. - P. 159–163.
92. Wynn, R. Inhibition of human beta-factor XIIa by squash family serine proteinase inhibitors / R.Wynn, M.Laskowski // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1990. - Vol. 166, N 3. - P. 1406–1410.

93. Campos, I.T.N. Infestin, a thrombin inhibitor presents in *Triatoma infestans* midgut, a Chagas' disease vector: gene cloning, expression and characterization of the inhibitor / I.T.N.Campos, R.Amino, C.A.M.Sampaio, E.A.Auerswald, T.Friedrich, H.-G.Lemaire, S.Schenkman, A.S.Tanaka // *Insect Biochem. Mol. Biol.* - 2002. - Vol. 32, N 9. - P. 991–997.
94. Bode, W. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases / W.Bode, R.Huber // *Eur. J. Biochem.* - 1992. - Vol. 204, N 2. - P. 433–451.
95. Hojima, Y. Hageman factor fragment inhibitor in corn seeds: purification and characterization / Y.Hojima, J.V.Pierce, J.J.Pisano // *Thromb. Res.* - 1980. - Vol. 20, N 2. - P. 149–162.
96. Krishnamoorthi, R. A new protein inhibitor of trypsin and activated Hageman factor from pumpkin (*Cucurbita maxima*) seeds / R.Krishnamoorthi, Y.X.Gong, M.Richardson // *FEBS Lett.* - 1990. - Vol. 273, N 1–2. - P. 163–167.
97. Ling, M.H. Protein, cDNA, and genomic DNA sequences of the towel gourd trypsin inhibitor. A squash family inhibitor / M.H.Ling, H.Y.Qi, C.W.Chi // *J. Biol. Chem.* - 1993. - Vol. 268, N 2. - P. 810–814.
98. Campos, I.T.N. Identification and characterization of a novel factor XIIa inhibitor in the hematophagous insect, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) / I.T.N.Campos, A.M.Tanaka-Azevedo, A.S.Tanaka // *FEBS Lett.* - 2004. - Vol. 577, N 3. - P. 512–516.
99. Lovato, D.V. The full-length cDNA of anticoagulant protein infestin revealed a novel releasable Kazal domain, a neutrophil elastase inhibitor lacking anticoagulant activity / D.V.Lovato, I.T.N.Campos, R.Amino, A.S.Tanaka // *Biochimie.* - 2006. - Vol. 88, N 6. - P. 673–681.
100. Campos, I.T.N. The Kazal-type inhibitors infestins 1 and 4 differ in specificity but are similar in three-dimensional structure / I.T.N.Campos, T.A.C.B.Souza, R.J.S.Torquato, R.De Marco, A.M.Tanaka-Azevedo, A.S.Tanaka, J.A.R.G.Barbosa // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* - 2012. - Vol. 68, N 6. - P. 695–702.
101. Mende, K. Dipetalogastin, a potent thrombin inhibitor from the blood-sucking insect. *Dipetalogaster maximus* cDNA cloning, expression and characterization / K.Mende, O.Petoukhova, V.Koulitchkova, G.A.Schaub, U.Lange, R.Kaufmann, G.Nowak // *Eur. J. Biochem.* - 1999. - Vol. 266, N 2. - P. 583–590.
102. Araujo, R.N. Brasiliensin: A novel intestinal thrombin inhibitor from *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) with an important role in blood intake / R.N.Araujo, I.T.N.Campos, A.S.Tanaka, A.Santos, N.F.Gontijo, M.J.Lehane, M.H.Pereira // *Int. J. Parasitol.* - 2007. - Vol. 37, N 12. - P. 1351–1358.
103. Корнеева, В.А. Ингибитор из кукурузы на страже свертывания крови / В.А.Корнеева // *Природа.* - 2015. Вып. 2. - С. 31–37.

104. Hazegh-Azam, M. The corn inhibitor of activated Hageman factor: purification and properties of two recombinant forms of the protein / M.Hazegh-Azam, S.S.Kim, S.Masoud, L.Andersson, F.White, L.Johnson, S.Muthukrishnan, G.Reeck // *Protein Expr. Purif.* - 1998. - Vol. 13, N 2. - P. 143–149.
105. Chen, Z.Y. Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli* / Z.Y.Chen, R.L.Brown, A.R.Lax, T.E.Cleveland, J.S.Russin // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1999. - Vol. 65, N 3. - P. 1320–1324.
106. Baeriswyl, V. A synthetic factor XIIa inhibitor blocks selectively intrinsic coagulation initiation / V.Baeriswyl, S.Calzavarini, S.Chen, A.Zorzi, L.Bologna, A.Angelillo-Scherrer, C.Heinis // *ACS Chem. Biol.* - 2015. - Vol. 10, N 8. - P. 1861–1870.
107. Hojima, Y. Plant inhibitors of serine proteinases: Hageman factor fragment, kallikreins, plasmin, thrombin, factor Xa, trypsin, and chymotrypsin / Y.Hojima, J.V.Pierce, J.J.Pisano // *Thromb. Res.* - 1980. - Vol. 20, N 2. - P. 163–171.
108. Hojima, Y. Pumpkin seed inhibitor of human factor XIIa (activated Hageman factor) and bovine trypsin / Y.Hojima, J.V.Pierce, J.J.Pisano // *Biochemistry.* - 1982. - Vol. 21, N 16. - P. 3741–3746.
109. Leluk, J. Preparation and characteristics of trypsin inhibitors from the seeds of squash (*Cucurbita maxima*) and zucchini (*Cucurbita pepo* var. *Giromontia*) / J.Leluk, J.Otlewski, M.Wieczorek, A.Polanowski, T.Wilusz // *Acta Biochim. Pol.* - 1983. - Vol. 30, N 2. - P. 127–138.
110. Wieczorek, M. The squash family of serine proteinase inhibitors. Amino acid sequences and association equilibrium constants of inhibitors from squash, summer squash, zucchini, and cucumber seeds / M.Wieczorek, J.Otlewski, J.Cook, K.Parks, J.Leluk, A.Wilimowska-Pelc, A.Polanowski, T.Wilusz, M.Laskowski // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1985. - Vol. 126, N 2. - P. 646–652.
111. Bode, W. The refined 2.0 Å X-ray crystal structure of the complex formed between bovine beta-trypsin and CMTI-I, a trypsin inhibitor from squash seeds (*Cucurbita maxima*). Topological similarity of the squash seed inhibitors with the carboxypeptidase A inhibitor from potatoes / W.Bode, H.J.Greyling, R.Huber, J.Otlewski, T.Wilusz // *FEBS Lett.* - 1989. - Vol. 242, N 2. - P. 285–292.
112. Thaimattam, R. Atomic resolution structure of squash trypsin inhibitor: unexpected metal coordination / R.Thaimattam, E.Tykarska, A.Bierzynski, G.M.Sheldrick, M.Jaskolski // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* - 2002. - Vol. 58, N 9. - P. 1448–1461.
113. Kojima, S. Synthesis of a squash-type protease inhibitor by gene engineering and effects of replacements of conserved hydrophobic amino acid residues on its inhibitory activity / S.Kojima, K.Miyoshi, K.Miura // *Protein Eng.* - 1996. - Vol. 9, N 12. - P. 1241–1246.
114. Grzesiak, A. Inhibition of serine proteinases from human blood clotting system by squash inhibitor mutants / A.Grzesiak, O.Buczek, I.Petry, Z.Szewczuk, J.Otlewski // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2000. - Vol. 1478, N 2. - P. 318–324.

115. Liu, J. NMR studies of internal dynamics of serine proteinase protein inhibitors: Binding region mobilities of intact and reactive-site hydrolyzed Cucurbita maxima trypsin inhibitor (CMTI)-III of the squash family and comparison with those of counterparts of CMTI / J.Liu, Y.Gong, O.Prakash, L.Wen, I.Lee, J.K.Huang, R.Krishnamoorthi // *Protein Sci.* - 1998. - Vol. 7, N 1. - P. 132–141.
116. Hayashi, K. Inhibition of serine proteases of the blood coagulation system by squash family protease inhibitors / K.Hayashi, T.Takehisa, N.Hamato, R.Takano, S.Hara, T.Miyata, H.Kato // *J. Biochem.* - 1994. - Vol. 116, N 5. - P. 1013–1018.
117. Aoki, K. Peptide-based delivery to bone / K.Aoki, N.Alles, N.Soyso, K.Ohya // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2012. - Vol. 64, N 12. - P. 1220–1238.
118. Woodruff, R.S. Inhibiting the intrinsic pathway of coagulation with a factor XII-targeting RNA aptamer / R.S.Woodruff, Y.Xu, J.Layzer, W.Wu, M.L.Ogletree, B.A.Sullenger // *J. Thromb. Haemost.* - 2013. - Vol. 11, N 7. - P. 1364–1373.
119. Dyke, C.K. First-in-human experience of an antidote-controlled anticoagulant using RNA aptamer technology: a phase 1a pharmacodynamic evaluation of a drug-antidote pair for the controlled regulation of factor IXa activity / C.K.Dyke, S.R.Steinhubl, N.S.Kleiman, R.O.Cannon, L.G.Aberle, M.Lin, S.K.Myles, C.Melloni, R.A.Harrington, J.H.Alexander, R.C.Becker, C.P.Rusconi // *Circulation.* - 2006. - Vol. 114, N 23. - P. 2490–2497.
120. Позмогова, Г.Е. Антикоагуляционные свойства и стабильность в плазме крови тиоаналогов тромбинсвязывающего ДНК-аптамера / Г.Е.Позмогова, М.А.Зайцева, И.П.Смирнов, А.Г.Швачко, М.А.Мурина, В.И.Сергиенко // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* - 2010. - Т. 150, Вып. 2. - С. 142–147.
121. Varizhuk, A.M. Synthesis, characterization and in vitro activity of thrombin-binding DNA aptamers with triazole internucleotide linkages / A.M.Varizhuk, V.B.Tsvetkov, O.N.Tatarinova, D.N.Kaluzhny, V.L.Florentiev, E.N.Timofeev, A.K.Shchlyolkina, O.F.Borisova, I.P.Smirnov, S.L.Grokhovsky, A.V.Aseychev, G.E.Pozmogova // *Eur. J. Med. Chem.* - 2013. - Vol. 67. - P. 90–97.
122. Swedberg, J.E. Substrate-guided design of selective FXIIa inhibitors based on the plant-derived *Momordica cochinchinensis* trypsin inhibitor-II (MCoTI-II) scaffold / J.E.Swedberg, T.Mahatmanto, H.Abdul Ghani, S.J. de Veer, C.I.Schroeder, J.M.Harris, D.J.Craik // *J. Med. Chem.* - 2016. - Vol. 59, N 15. - P. 7287–7292.
123. Laskowski, M. Protein inhibitors of proteinases / M.Laskowski, I.Kato // *Annu. Rev. Biochem.* - 1980. - Vol. 49. - P. 593–626.
124. Robert, S. Novel 3-carboxamide-coumarins as potent and selective FXIIa inhibitors / S.Robert, C.Bertolla, B.Masereel, J.-M.Dogné, L.Pochet // *J. Med. Chem.* - 2008. - Vol. 51, N 11. - P. 3077–3080.

125. Bouckaert, C. Synthesis, evaluation and structure-activity relationship of new 3-carboxamide coumarins as FXIIa inhibitors / C.Bouckaert, S.Serra, G.Rondelet, E.Dolušić, J.Wouters, J.-M.Dogné, R.Frédéricq, L.Pochet // *Eur. J. Med. Chem.* - 2016. - Vol. 110. - P. 181–194.
126. Hoffmann, D. Two-stage method for protein-ligand docking / D.Hoffmann, B.Kramer, T.Washio, T.Steinmetzer, M.Rarey, T.Lengauer // *J. Med. Chem.* - 1999. - Vol. 42, N 21. - P. 4422–4433.
127. Zakharov, A.V. Quantitative prediction of antitarget interaction profiles for chemical compounds / A.V.Zakharov, A.A.Lagunin, D.A.Filimonov, V.V.Poroikov // *Chem. Res. Toxicol.* - 2012. - Vol. 25, N 11. - P. 2378–2385.
128. Погодин, П.В. Компьютерный прогноз взаимодействия низкомолекулярных органических соединений с белками-мишенями / П.В.Погодин, А.А.Лагунин, С.М.Иванов, В.И.Конова, Д.А.Филимонов, В.В.Поройков // *Вестник Российского Государственного Медицинского Университета.* - 2013. - Вып. 4. - С. 69–74.
129. Baeriswyl, V. Development of a selective peptide macrocycle inhibitor of coagulation factor XII toward the generation of a safe antithrombotic therapy / V.Baeriswyl, S.Calzavarini, C.Gerschheimer, P.Diderich, A.Angelillo-Scherrer, C.Heinis // *J. Med. Chem.* - 2013. - Vol. 56, N 9. - P. 3742–3746.
130. Schechter, I. On the size of the active site in proteases. I. Papain / I.Schechter, A.Berger // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1967. - Vol. 27, N 2. - P. 157–162.
131. Radisky, E.S. Insights into the serine protease mechanism from atomic resolution structures of trypsin reaction intermediates / E.S.Radisky, J.M.Lee, C.-J.K.Lu, D.E.Koshland // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2006. - Vol. 103, N 18. - P. 6835–6840.
132. Ekici, O.D. Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration / O.D.Ekici, M.Paetzel, R.E.Dalbey // *Protein Sci.* - 2008. - Vol. 17, N 12. - P. 2023–2037.
133. Hedstrom, L. Serine protease mechanism and specificity / L.Hedstrom // *Chem. Rev.* - 2002. - Vol. 102, N 12. - P. 4501–4524.
134. Zakharova, E. Structure of a serine protease poised to resynthesize a peptide bond / E.Zakharova, M.P.Horvath, D.P.Goldenberg // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2009. - Vol. 106, N 27. - P. 11034–11039.
135. Radisky, E.S. A clogged gutter mechanism for protease inhibitors / E.S.Radisky, D.E.Koshland // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2002. - Vol. 99, N 16. - P. 10316–10321.
136. Otlewski, J. The many faces of protease-protein inhibitor interaction / J.Otlewski, F.Jelen, M.Zakrzewska, A.Oleksy // *EMBO J.* - 2005. - Vol. 24, N 7. - P. 1303–1310.
137. Ozawa, K. The reactive site of trypsin inhibitors / K.Ozawa, M.Laskowski // *J. Biol. Chem.* - 1966. - Vol. 241, N 17. - P. 3955–3961.

138. Seemüller, U. Isolation and characterisation of a low molecular weight inhibitor (of chymotrypsin and human granulocytic elastase and cathepsin G) from leeches / U.Seemüller, M.Meier, K.Ohlsson, H.P.Müller, H.Fritz // Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem. - 1977. - Vol. 358, N 9. - P. 1105–1107.
139. Biochemistry / Ed.: L.Stryer. - 4th Edition. - New York, USA: W.H.Freeman and Company, 1995. - 1064 p. - P. 420.- ISBN 0716720094
140. Apostoluk, W. Variability of the canonical loop conformations in serine proteinases inhibitors and other proteins / W.Apostoluk, J.Otlewski // Proteins. - 1998. - Vol. 32, N 4. - P. 459–474.
141. Lu, S.M. Predicting the reactivity of proteins from their sequence alone: Kazal family of protein inhibitors of serine proteinases / S.M.Lu, W.Lu, M.A.Qasim, S.Anderson, I.Apostol, W.Ardelt, T.Bigler, Y.W.Chiang, J.Cook, M.N.James, I.Kato, C.Kelly, W.Kohr, T.Komiyama, T.-Y.Lin, M.Ogawa, J.Otlewski, S.-J.Park, S.Qasim, M.Ranjbar, M.Tashiro, N.Warne, H.Whatley, A.Wieczorek, M.Wieczorek, T.Wilusz, R.Wynn, W.Zhang, M.Laskowski Jr. // Proc. Natl. Acad. Sci. - 2001. - Vol. 98, N 4. - P. 1410–1415.
142. Crooks, G.E. WebLogo: a sequence logo generator / G.E.Crooks, G.Hon, J.-M.Chandonia, S.E.Brenner // Genome Res. - 2004. - Vol. 14, N 6. - P. 1188–1190.
143. Zhou, D. Crystal structures of a plant trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) and of its complex with bovine trypsin / D.Zhou, Y.A.Lobo, I.F.C.Batista, R.Marques-Porto, A.Gustchina, M.L.V.Oliva, A.Wlodawer // PLoS One. - 2013. - Vol. 8, N 4. - P. e62252.
144. Hipler, K. Active site binding loop stabilization in the subtilisin inhibitor eglin c: structural and functional studies on specifically designed mutants in complex with subtilisin and the uncomplexed inhibitor / K.Hipler, J.P.Priestle, J.Rahuel, M.G.Grütter // Adv. Exp. Med. Biol. - 1996. - Vol. 379. - P. 43–47.
145. Roussel, A. Complexation of two proteic insect inhibitors to the active site of chymotrypsin suggests decoupled roles for binding and selectivity / A.Roussel, M.Mathieu, A.Dobbs, B.Luu, C.Cambillau, C.Kellenberger // J. Biol. Chem. - 2001. - Vol. 276, N 42. - P. 38893–38898.
146. Swedberg, J.E. Mastering the canonical loop of serine protease inhibitors: enhancing potency by optimising the internal hydrogen bond network / J.E.Swedberg, S.J. de Veer, K.C.Sit, C.F.Reboul, A.M.Buckle, J.M.Harris // PLoS One. - 2011. - Vol. 6, N 4. - P. e19302.
147. De Veer, S.J. Engineered protease inhibitors based on sunflower trypsin inhibitor-1 (SFTI-1) provide insights into the role of sequence and conformation in Laskowski mechanism inhibition / S.J. de Veer, J.E.Swedberg, M.Akcan, K.J.Rosengren, M.Brattsand, D.J.Craik, J.M.Harris // Biochem. J. - 2015. - Vol. 469, N 2. - P. 243–253.

148. Khamrui, S. Identification of a novel set of scaffolding residues that are instrumental for the inhibitory property of Kunitz (STI) inhibitors / S.Khamrui, S.Majumder, J.Dasgupta, J.K.Dattagupta, U.Sen // *Protein Sci.* - 2010. - Vol. 19, N 3. - P. 593–602.
149. Majumder, S. Role of remote scaffolding residues in the inhibitory loop pre-organization, flexibility, rigidification and enzyme inhibition of serine protease inhibitors / S.Majumder, S.Khamrui, J.Dasgupta, J.K.Dattagupta, U.Sen // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2012. - Vol. 1824, N 7. - P. 882–890.
150. Hanson, W.M. Rigidification of a flexible protease inhibitor variant upon binding to trypsin / W.M.Hanson, G.J.Domek, M.P.Horvath, D.P.Goldenberg // *J. Mol. Biol.* - 2007. - Vol. 366, N 1. - P. 230–243.
151. Huntington, J.A. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation / J.A.Huntington, R.J.Read, R.W.Carrell // *Nature.* - 2000. - Vol. 407, N 6806. - P. 923–926.
152. Yang, L. The role of autolysis loop in determining the specificity of coagulation proteases / L.Yang, C.Manithody, A.R.Rezaie // *Brazilian J. Med. Biol. Res.* - 2007. - Vol. 40. - P. 1055–1064.
153. Kazakov, A.S. High-affinity interaction between interleukin-11 and S100P protein / A.S.Kazakov, A.S.Sokolov, V.A.Rastrygina, V.V.Solovyev, R.G.Ismailov, R.V.Mikhailov, A.B.Ulitin, A.R.Yakovenko, T.A.Mirzabekov, E.A.Permyakov, S.E.Permyakov // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2015. - Vol. 468, N 4. - P. 733–738.
154. Kazakov, A.S. Interleukin-11 binds specific EF-hand proteins via their conserved structural motifs / A.S.Kazakov, A.S.Sokolov, A.A.Vologzhannikova, M.E.Permyakova, P.A.Khorn, R.G.Ismailov, K.A.Denessiuk, A.I.Denesyuk, V.A.Rastrygina, V.E.Baksheeva, E.Yu.Zernii, D.V.Zinchenko, V.V.Glazatov, V.N.Uversky, T.A.Mirzabekov, E.A.Permyakov, S.E.Permyakov // *J. Biomol. Struct. Dyn.* - 2017. - Vol. 35, N 1. - P. 78–91.
155. Ho, S.N. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction / S.N.Ho, H.D.Hunt, R.M.Horton, J.K.Pullen, L.R.Pease // *Gene.* - 1989. - Vol. 77, N 1. - P. 51–59.
156. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M.Bradford // *Anal. Biochem.* - 1976. - Vol. 72, N 1–2. - P. 248–254.
157. *The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins* / QIAGEN. - 5th Edition. - Hilden, Germany: QIAGEN, 2003. - 127 p.
158. Humphrey, W. VMD: visual molecular dynamics / W.Humphrey, A.Dalke, K.Schulten // *J. Mol. Graph.* - 1996. - Vol. 14, N 1. - P. 33–38, 27–28.
159. Phillips, J.C. Scalable molecular dynamics with NAMD / J.C.Phillips, R.Braun, W.Wang, J.Gumbart, E.Tajkhorshid, E.Villa, C.Chipot, R.D.Skeel, L.Kalé, K.Schulten // *J. Comput. Chem.* - 2005. - Vol. 26, N 16. - P. 1781–1802.

160. Best, R.B. Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain $\chi(1)$ and $\chi(2)$ dihedral angles / R.B.Best, X.Zhu, J.Shim, P.E.M.Lopes, J.Mittal, M.Feig, A.D.Mackerell // *J. Chem. Theory Comput.* - 2012. - Vol. 8, N 9. - P. 3257–3273.
161. Sadovnichy, V.A. “Lomonosov”: supercomputing at Moscow State University / V.Sadovnichy, A.Tikhonravov, V.I.Voevodin, V.Opanasenko // In: *Contemporary high performance computing: from petascale toward exascale (Chapman & Hall/CRC Computational Science)*/ Ed.: J.S. Vetter. - Boca Raton, USA: CRC Press, 2013. - P. 283–307.
162. Wu, Y. Structural insight into distinct mechanisms of protease inhibition by antibodies / Y.Wu, C.Eigenbrot, W.-C.Liang, S.Stawicki, S.Shia, B.Fan, R.Ganesan, M.T.Lipari, D.Kirchhofer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2007. - Vol. 104, N 50. - P. 19784–19789.
163. 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.Pantelev, F.I.Ataullakhanov // *J. Biol. Chem.* - 2014. - Vol. 289, N 20. - P. 14109–14120.
164. Salonen, L.M. Cation- π interactions at the active site of factor Xa: dramatic enhancement upon stepwise N-alkylation of ammonium ions / L.M.Salonen, C.Bucher, D.W.Banner, W.Haap, J.-L.Mary, J.Benz, O.Kuster, P.Seiler, W.B.Schweizer, F.Diederich // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* - 2009. - Vol. 48, N 4. - P. 811–814.
165. Figueiredo, A.C. Rational design and characterization of D-Phe-Pro-D-Arg-derived direct thrombin inhibitors / A.C.Figueiredo, C.C.Clement, S.Zakia, J.Gingold, M.Philipp, P.J.B.Pereira // *PLoS One.* - 2012. - Vol. 7, N 3. - P. e34354.
166. Comeau, S.R. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes / S.R.Comeau, D.W.Gatchell, S.Vajda, C.J.Camacho // *Bioinformatics.* - 2004. - Vol. 20, N 1. - P. 45–50.
167. London, N. Rosetta FlexPepDock web server--high resolution modeling of peptide-protein interactions / N.London, B.Raveh, E.Cohen, G.Fathi, O.Schueler-Furman // *Nucleic Acids Res.* - 2011. - Vol. 39, Web Server issue. - P. W249–253.
168. Jiménez-García, B. pyDockWEB: a web server for rigid-body protein-protein docking using electrostatics and desolvation scoring / B.Jiménez-García, C.Pons, J.Fernández-Recio // *Bioinformatics.* - 2013. - Vol. 29, N 13. - P. 1698–1699.
169. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. Schrödinger, LLC.
170. Cheng, Y. Relationship between the inhibition constant (K_1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction / Y.Cheng, W.H.Prusoff // *Biochem. Pharmacol.* - 1973. - Vol. 22, N 23. - P. 3099–3108.

171. 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.Pantelev // *PLoS One*. - 2015. - Vol. 10, N 12. - P. e0144940.
172. CLSI. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; Approved guideline - fifth edition. CLSI document H21-A5. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. - Vol. 28, N 5. - 33 p. - ISBN 1-56238-657-3.
173. Tarandovskiy, I.D. Investigation of the phenotype heterogeneity in severe hemophilia A using thromboelastography, thrombin generation, and thrombodynamics / I.D.Tarandovskiy, A.N.Balandina, K.G.Kopylov, N.I.Konyashina, M.A.Kumskova, M.A.Pantelev, F.I.Ataullakhanov // *Thromb. Res.* - 2013. - Vol. 131, N 6. - P. e274–280.
174. Фадеева, О.А. Тромбопластин, иммобилизованный на полистироловой поверхности, обладает кинетическими характеристиками, близкими к таковым для нативного белка, и активирует свертывание крови *in vitro* аналогично тромбопластину на фибробластах / О.А.Фадеева, М.А.Пантелеев, С.С.Карамзин, А.Н.Баландина, И.В.Смирнов, Ф.И.Атауллаханов // *Биохимия*. - 2010. - Т. 75, Вып. 6. - С. 827–838.
175. Shen, S.H. Multiple joined genes prevent product degradation in *Escherichia coli* / S.H.Shen // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1984. - Vol. 81, N 15. - P. 4627–4631.
176. Andreev, Y.A. Cyanogen bromide cleavage of proteins in salt and buffer solutions / Y.A.Andreev, S.A.Kozlov, A.A.Vassilevski, E.V.Grishin // *Anal. Biochem.* - 2010. - Vol. 407, N 1. - P. 144–146.
177. Sugase, K. Overexpression of post-translationally modified peptides in *Escherichia coli* by co-expression with modifying enzymes / K.Sugase, M.A.Landes, P.E.Wright, M.Martinez-Yamout // *Protein Expr. Purif.* 2008. Vol. 57, № 2. P. 108–115.
178. Mattheij, N.J.A. Coated platelets function in platelet-dependent fibrin formation via integrin IIb 3 and transglutaminase factor XIII / N.J.A.Mattheij, F.Swieringa, T.G.Mastenbroek, M.A.Berny-Lang, F.May, C.C.F.M.J.Baaten, P.E.J. van der Meijden, Y.M.C.Henskens, E.A.M.Beckers, D.P.L.Suylen, M.W.Nolte, T.M.Hackeng, O.J.T.McCarty, J.W.M.Heemskerk, J.M.E.M.Cosemans // *Haematologica*. - 2016. - Vol. 101, N 4. - P. 427–436.
179. 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.
180. Abaeva, A.A. Procoagulant platelets form an alpha-granule protein-covered “cap” on their

surface that promotes their attachment to aggregates / A.A.Abaeva, M.Canault, Y.N.Kotova, S.I.Obydenny, 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.Pantelev // *J. Biol. Chem.* - 2013. - Vol. 288, N 41. - P. 29621–29632.

181. Hansson, K.M. The effect of corn trypsin inhibitor and inhibiting antibodies for FXIa and FXIIa on coagulation of plasma and whole blood / K.M.Hansson, S.Nielsen, M.Elg, J.Deinum // *J. Thromb. Haemost.* - 2014. - Vol. 12, N 10. - P. 1678–1686.

182. Butenas, S. The effect of corn trypsin inhibitor and inhibiting antibodies for FXIa and FXIIa on coagulation of plasma and whole blood: comment / S.Butenas, K.G.Mann // *J. Thromb. Haemost.* - 2015. - Vol. 13, N 3. - P. 487–488.

183. Parunov, L.A. The effect of corn trypsin inhibitor and inhibiting antibodies for FXIa and FXIIa on coagulation of plasma and whole blood: comment / L.A. Parunov, S.S.Surov, E.Tucker, M.V.Ovanesov // *J. Thromb. Haemost.* - 2015. - Vol. 13, N 8. - P. 1527–1530.

184. Johnson, D.J.D. Molecular basis of factor IXa recognition by heparin-activated antithrombin revealed by a 1.7-Å structure of the ternary complex / D.J.D.Johnson, J.Langdown, J.A.Huntington // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2010. - Vol. 107, N 2. - P. 645–650.

185. Holmes, M.B. Novel, bedside, tissue factor-dependent clotting assay permits improved assessment of combination antithrombotic and antiplatelet therapy / M.B.Holmes, D.J.Schneider, M.G.Hayes, B.E.Sobel, K.G.Mann // *Circulation.* - 2000. - Vol. 102, N 17. - P. 2051–2057.

186. 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.