

УДК 577.157.2

МЕЗОТРОМБИН — ПРОИЗВОДНОЕ ПРОТРОМБИНА — Na⁺-ЗАВИСИМЫЙ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЙ ЭНЗИМ

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

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

E-mail: yusova07@mail.ru

Согласно современным представлениям о механизме активации протромбина проэнзим и его промежуточная активная форма мезотромбин находятся в альтернативных конформациях, определяющих последовательное расщепление двух пептидных связей в молекуле протромбина, необходимых для его превращения в тромбин. Конформация протромбина является оптимальной для расщепления связи Arg 320-Phe321, в то время как мезотромбина — Arg 271-Thr272.

Мезотромбин, в отличие от тромбина, имеет слабовыраженные прокоагулянтные свойства и повышенную антикоагулянтную активность, опосредованную тромбомодулинзависимой активацией протеина С. Он может регулировать фибринолитический процесс через тромбомодулинзависимую активацию ингибитора фибринолиза (ТАФИ).

Мезотромбин, подобно тромбину, взаимодействует с фибриногеном, тромбомодулином и протеином С. Его специфичность зависит от связывания ионов натрия. Обнаружено, что своеобразные прокоагулянтные свойства мезотромбина — активация факторов V и VIII на мембранах и антикоагулянтные, обусловленные активацией связанного с тромбомодулином протеина С, регулируются Na⁺ как эффектором его каталитической функции. Кроме того, Na⁺ влияет на активность мезотромбина, увеличивая сродство лигандов к экзосайту I и направляя активацию протромбина на образование тромбина непосредственно из быстрой формы мезотромбина. Na⁺-зависимая аллостерия мезотромбина раскрывает новые подходы для регуляции его активности и специфичности действия.

Ключевые слова: протромбин, мезотромбин, фактор V свертывания крови, экзосайты I и II тромбина, связывание Na⁺, аллостерическая регуляция.

Протеиназа свертывания крови — тромбин появляется в плазме после расщепления протромбина протромбиназным комплексом, в состав которого входят факторы Ха и Va, фосфолипиды и ионы кальция [1, 2]. Скорость реакции превращения протромбина в тромбин, катализируемой фактором Ха, повышается в ~300 000 раз в сочетании с протеиновым кофактором, фактором Va и ионами кальция. Фактор Va в протромбиназном комплексе регулирует последовательность расщепления пептидных связей в процессе активации протромбина, определяя гидролиз фактором Ха связи Arg 320-Phe 321 в протеиназном домене и генерацию каталитически активного промежуточного мезотромбина, а также последующий гидролиз связи Arg 271-Thr 272 между каталитическим доменом и фрагментом 1–2 протромбина, продуцируя тромбин и фрагмент 1–2 [2–5]. В отсутствие фактора Va преобладает

более медленный путь активации протромбина, при котором первоначальное расщепление в положении Arg 271 приводит к образованию неактивного промежуточного протромбина 2, в котором отщепленный фрагмент 1·2 нековалентно связан с основной частью молекулы, а последующее расщепление в положении Arg 320 — к образованию тромбина (схема).

Показано, что протромбин в протромбиназном комплексе может находиться в двух конформациях, определяющих последовательность расщепления пептидных связей фактором Ха. Конформационные изменения, сопровождающие появление каталитического центра при превращении протромбина в мезотромбин в протромбиназном комплексе, регулируют его активацию, обеспечивая переход конформационного состояния молекулы от зимогена к энзиму [6–14].

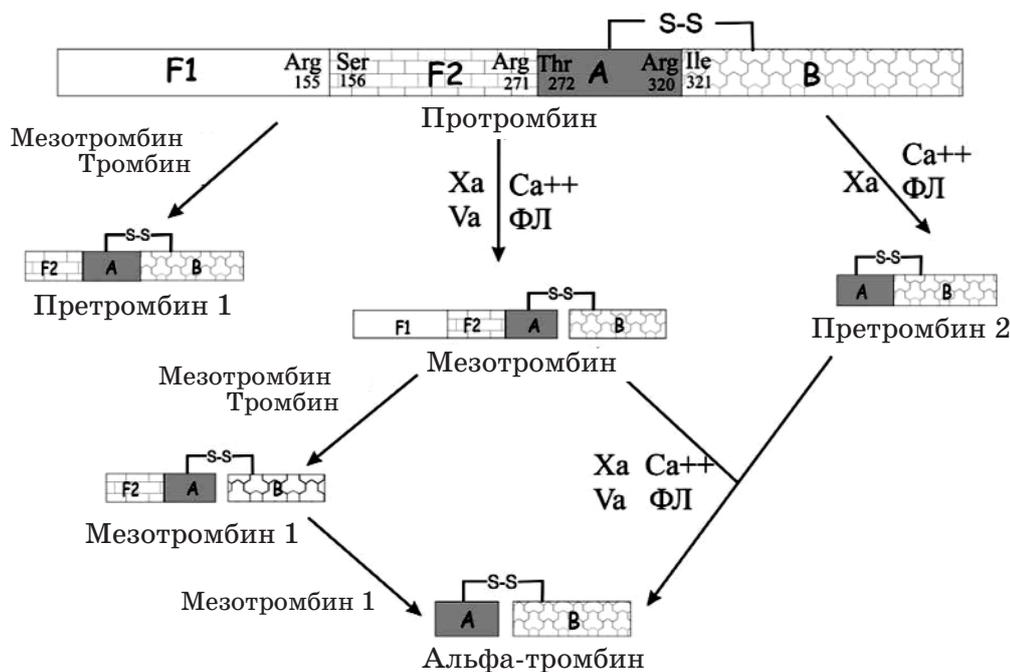


Схема процесса активации протромбина

Связывание кофактора Va с протромбином и фактором Ха необходимо для оптимальной функции протромбиназы при физиологических условиях. Основным механизмом, согласно которому фактор Va увеличивает каталитическую эффективность фактора Ха, является связывание энзима и субстрата, что приводит к структурным перестройкам вокруг расщепляемых пептидных связей и изменению их доступности. В составе протромбиназы фактор Va направляет фактор Ха для эффективного катализа протромбина [15–18]. В протромбиназном комплексе фактор Va оказывает двойной эффект — рецепторный и эффекторный. Рецепторный эффект фактора Va обусловлен взаимодействием с энзимом, связанным с мембраной, с образованием бинарного комплекса, в то время как эффекторный эффект более сложный и требует тщательного рассмотрения молекулярной динамики, связанной с функцией протромбиназы и обуславливающей экспрессию экзосайтов при активации протромбина. Взаимодействие протромбина с аминокислотными остатками фактора Va в составе протромбиназы может вызывать перераспределение аминокислотных остатков вокруг связи Arg320–Ile321 таким образом, что они становятся доступными для эффективного расщепления фактором Ха в составе протромбиназы [19–24].

В протромбиназном комплексе именно фактор Va направляет активацию протром-

бина фактором Ха на образование мезотромбина, при котором и происходит первоначальное расщепление связи в положении Arg 320 (путь MzT) [6,8,19,22].

Активация протромбина сопровождается экспонированием в молекуле тромбина регуляторных экзосайтов I и II. Предполагается, что фактор Va в составе протромбиназного комплекса непосредственно взаимодействует с проэксосайтом I протромбина [19]. В С-концевом фрагменте тяжелой цепи фактора Va (в пределах 659–698 аминокислотных остатков) находится участок связывания, комплементарный проэксосайту I протромбина. Эта область фактора Va содержит несколько сульфатированных тирозинов, необходимых для активации фактора как V тромбином, так и протромбина протромбиназным комплексом [23]. Показано, что пентапептид с аминокислотной последовательностью 695–699 (Asp-Tyr-Asp-Tyr-Gln) с С-конца тяжелой цепи фактора Va конкурентно ингибирует активацию протромбина протромбиназой. Электрофоретический анализ продуктов активации протромбина показал, что возрастающие концентрации пептида приводят к полному ингибированию образования мезотромбина. Вместе с тем имеет место генерация тромбина через образование претромбина 2. Полученные результаты позволили сделать вывод, что пептид ингибирует гидролиз протромбиназой пептидной связи в протромбине в положении

Arg 320. Для подтверждения этого факта была изучена активация молекул рекомбинантного протромбина rP-II (R155A/R284A/R271A) и rP₂-II (R155A/R284A/R320A), в которых могла быть гидролизована только одна связь в положении Arg 320 или Arg 271, соответственно. Обнаружено, что расщепление rP-II протромбиназой полностью ингибируется низкими концентрациями пентапептида, в то же время только высокие концентрации пептида необходимы для подавления активации rP₂-II. Пентапептид в отсутствие фактора Va также препятствует активации протромбина фактором Ха, связанным с мембраной, увеличивая при этом скорость гидролиза в положении Arg271 протромбина или rP₂-II. Эти данные подтверждают, что пентапептид Asp-Tyr-Asp-Tyr-Gln оказывает противоположное влияние на фактор Ха при гидролизе протромбина в зависимости от включения фактора Va в протромбиназу [23–26].

Было также установлено, что пептид гирудина Hir-54-65 (SO₃⁻) является специфическим ингибитором протромбиназы. Чтобы понять роль фактора Va в составе протромбиназы на молекулярном уровне, была изучена генерация тромбина в присутствии отдельно взятых фрагментов протромбина или их комбинации. Активация протромбина 1 протромбиназой — медленный процесс, в котором расщепление связей в положении Arg 320 и Arg 271 происходит с одинаковой скоростью. Прибавление очищенного фрагмента 1 к протромбину 1 повышает скорость гидролиза связи в положении Arg 320 и образование тромбина. Обе реакции ингибируются пептидом гирудина, тогда как пентапептид Asp-Tyr-Asp-Tyr-Gln не оказывает значительного ингибиторного эффекта на расщепление протромбина 1 в присутствии фрагмента 1 или без него. Аналогично, активация протромбина 2 протромбиназой ингибировалась Hir54-65 (SO₃⁻), но не пентапептидом. Прибавление очищенного фрагмента 1–2 к протромбину 2 повышает скорость его расщепления в положении Arg 320 протромбиназой, что приводит к значительному ингибированию пептидом Asp-Tyr-Asp-Tyr-Gln образования тромбина и одновременному подавлению ингибиторного эффекта пептидом гирудина. Далее было обнаружено, что тройной комплекс протромбин 2 — фрагмент 1–2 — Hir 54-65 (SO₃⁻) ингибируется пентапептидом. Приведенные дополнительные данные показали, что связывание фрагмента 1 с мембраной необходимо для усиления кофакторной активности фактора Va,

который, в свою очередь, приводит к эффективному расщеплению протромбина протромбиназой в положении Arg 320 [25–27].

При превращении протромбина в тромбин на поверхности энзима появляются два экзосайта — I и II — с положительно заряженными аминокислотными остатками, которые обеспечивают узнавание физиологических субстратов, ингибиторов и регуляторных молекул [5, 27–35]. Экзосайт I участвует в связывании энзима с фибриногеном, фибрином, 1-м и 4-м рецепторами, активируемыми протеиназой (PAR-1 и PAR-4), и COOH-концевым пептидом гирудина — 54–65 (SO₃⁻). Экзосайт II связывает гепарин и фрагмент 2 протромбина. Оба экзосайта участвуют в активации тромбином факторов V и VIII, гликопротеина Ib, инактивации тромбина кофактором II гепарина и связывают тромбомодулин [28–34].

Известно, что взаимодействие Na⁺ с тромбином аллостерически регулирует переход энзима из медленной (slow-) в быструю (fast-) форму [35–42]. Быстрая форма тромбина имеет более высокую каталитическую эффективность (k_{cat}/K_m) к прокоагулянтным субстратам (фибриноген, PAR-1), более высокую реактивность к антитромбину и увеличенную амидазную активность [40, 43]. Исследование аланинзамещенного мутантного тромбина и рентгеноструктурный анализ его быстрой и медленной форм дали возможность получить характеристику аллостерического перехода в быструю форму энзима: 1) расположение аминокислотных остатков, стабилизирующих сайт связывания Na⁺; 2) изменение в ориентации Asp 189 в сайте первичной субстратной специфичности; 3) перемещение боковой цепи Glu 192, которая связана сетью молекул воды с Ser 195; 4) изменение в ориентации Ser 195, который оптимизирует катализ [21, 24–26]. Подробно эта проблема обсуждалась в ряде публикаций Di Cera и соавт., в которых отмечено, что данные о структуре энзима согласуются с кинетическими исследованиями связывания Na⁺ [39, 44–47].

Сравнительные исследования взаимодействия С-концевого пептида гирудина Hir-(54–65) (SO₃⁻) с промежуточными формами протромбина показали появление и формирование в процессе активации проэнзима (про)экзосайта I. При удалении фрагмента 1 от протромбина отмечено 7-кратное увеличение сродства пептида гирудина к образующемуся протромбину 1, что указывает на появление экзосайта I. Дальнейшее увеличение сродства в 11–20 раз свидетельствует

о полном формировании экзосайта I, обуславливающим каталитическую активность мезотромбина и тромбина [21, 22, 48].

Количественный анализ связывания фрагментов протромбина 1–2 и 2 с экзосайтом II претромбина 2 и тромбина указывает, что этот участок становится открытым для взаимодействия с лигандами после расщепления связи в положении Arg 271 и последующей диссоциации фрагментов [21, 22]. На сегодняшний день достоверно не установлено, существует ли связь между Na^+ -связывающим сайтом и (про)экзосайтом I, который образуется во время активации протромбина.

Расщепление связи в положение Arg 320 протромбина или претромбина 1 инициирует формирование каталитического центра и (про)экзосайта I. Для выявления зависимости между Na^+ -связывающим сайтом и (про)экзосайтом I исследовали влияние ионов натрия на взаимодействие флуоресцентно меченого пептида гирудина [5F] Hir-(54–65) (SO_3^-) с продуктами активации протромбина. При сравнении протромбина, претромбинов 1 и 2 выявлено, что формирование (про)экзосайта I не зависит от присутствия Na^+ , в то время как гидролиз связи в положении Arg 320 приводит к тому, что сродство мезотромбина (MzT) и мезотромбина, лишённого фрагмента 1 (MzT(-F1), к пептиду гирудина возрастает в 8–10 и 5–6 раз соответственно в присутствии ионов натрия. Исследование кинетики гидролиза хромогенных субстратов продуктами активации протромбина впервые показало повышение скорости реакции ионами Na^+ для MzT и MzT(-F1), что свидетельствует об их аллостерической регуляции этим катионом. Полученные результаты дают основания для предположения, что своеобразная прокоагулянтная субстратная специфичность MzT, а именно активация факторов V и VIII, встроенных в мембрану, и антикоагулянтная активность, обусловленная активацией протеина C в комплексе с тромбомодулином, регулируется ионами Na^+ , вызывающими аллостерическое изменение конформации молекул MzT и MzT(-F1). Кроме того, данные о повышении активности MzT и сродства его экзосайта I к лигандам ионами Na^+ указывает на возможность их участия в активации протромбина, обеспечивая генерацию тромбина из быстрой формы MzT [21, 49–52].

Аллостерическая регуляция специфичности и активности тромбина ионами натрия предполагает, что различия в специфичности MzT также могут регулироваться переходом медленной формы MzT в быст-

рую. Увеличение сродства экзосайта MzT и его каталитической активности при связывании Na^+ влияет на узнавание MzT как субстрата протромбиназным комплексом. Можно полагать, что обнаруженное отсутствие связи между Na^+ -связывающим сайтом и (про)экзосайтом I объясняется неспособностью всех зимогенных форм: протромбина, претромбина 1 и претромбина 2 связывать Na^+ . Следует учитывать, что для проявления аллостерического эффекта ионов натрия необходимы конформационные изменения, которые имеют место в каталитическом домене при образовании активного центра [51–53]. Приведенные данные полностью согласуются со структурным анализом быстрой и медленной форм тромбина, нативных и инактивированных D-Phe-Pro-Arg- CH_2Cl и их комплексов с Hir-(54–65) (SO_3^-) [39, 54]. Изменение сродства экзосайта I к различным лигандам при взаимодействии тромбина с ионами натрия можно объяснить изменением конформации аминокислотных остатков в S1–S4-участках энзима, что обуславливает нарушение связи между Ser195 и His57.

Исследование влияния ионов натрия на скорость гидролиза хромогенного субстрата (D-Phe-Pip-Arg-pNA) тромбином, MzT^{R155A} и MzT(-F1) показало снижение сродства MzT^{R155A} к субстрату в присутствии Na^+ . Полученный результат авторы объясняют наличием в MzT^{R155A} фрагмента 1, который стерически или конформационно может влиять на активный центр, сайт связывания Na^+ или экзосайт I. Хотя механизм регуляции активности MzT^{R155A} ионами Na^+ не выяснен, впервые установлено, что MzT(-F1) и MzT^{R155A} являются Na^+ -регулируемыми протеиназами, демонстрирующими связь между натрий-связывающим участком и экзосайтом I.

Известно, что связывание ионов натрия с тромбином кардинально изменяет его специфичность по отношению к прокоагулянтным и антикоагулянтным субстратам [28–31, 36, 37]. Быстрая Na^+ -связанная форма тромбина эффективнее расщепляет фибриноген, фибрин, факторы V и VIII, PAR-1, в то время как медленная Na^+ -несвязанная форма энзима проявляет более высокую активность к протеину C [52]. MzT(-F1), несмотря на наличие активного центра и экзосайта I, имеет не более 10% активности тромбина по отношению к фибриногену и очень слабую способность (~2%) активировать тромбоциты [51]. Тромбин активирует фактор V как в растворе, так и связанный с фосфолипидными мембранами [27, 51, 55–58],

а MzT — только связанный с мембранами [27, 35, 50]. Учитывая факт, что активация фактора V осуществляется быстрой формой тромбина, можно полагать, что и MzT действует в этой форме и его активность регулируется ионами натрия. В условиях физиологической концентрации ионов натрия (140 мМ), рН и температуры константа диссоциации связывания Na^+ с тромбином составляет 110 мМ. Следовательно, 60% тромбина будет находиться в связанном с Na^+ состоянии в виде быстрой, а 40% — в свободном состоянии в виде медленной формы [38, 51, 59, 60]. Константа диссоциации связывания Na^+ с MzT не определена, хотя можно ожидать, что она будет аналогичной.

В комплексе тромбин–тромбомодулин медленная форма тромбина становится мощной антикоагулянтной протеиназой вследствие частичной потери специфичности по отношению к фибриногену и иным прокоагулянтным субстратам и значительного увеличения эффективности активации протеина С [28–31, 50–52]. Скорость активации протеина С протеиназами MzT и MzT(-F1) также усиливается тромбомодулином подобно тромбину и даже сильнее, если MzT связан с фосфолипидной мембраной. Это подтверждает важную физиологическую роль MzT как антикоагулянта. Появляется все больше данных, указывающих, что подобно тромбину Na^+ -связанная и свободная формы MzT могут проявлять более высокую прокоагулянтную или антикоагулянтную активность, соответственно [36, 48, 51].

Мезотромбин является физиологически активным промежуточным продуктом, генерация которого имеет место при расщеплении единственной связи в положении Arg 320 с образованием двух А- и В-цепей [25, 61]. В настоящее время появляется все больше доказательств, что мезотромбин, подобно тромбину, является Na^+ -активируемым энзимом. Рентгеноструктурный анализ кристаллического MzT(-F1) в комплексе с ингибитором активного центра РРАСК (D-Phe-Pro-Arg-хлорметилкетон) показал, что структура Na^+ -связывающего сайта мезотромбина практически идентична таковому тромбина человека [19, 23, 24, 61]. Кроме того, кинетические исследования MzT(-F1), свидетельствующие о незначительном уменьшении k_{obs} при увеличении концентрации Na^+ , наблюдаемые при слабом изменении флуоресценции, подтверждают существование трех конформаций мезотромбина: неактивной MzT E*, активной E и активной Na^+ -связанной E· Na^+ , которые находятся в состо-

янии равновесия. Доказательство существования различных конформаций мезотромбина дает новую информацию о механизме активации протромбина [25, 62].

Современные исследования активации протромбина подтверждают механизм, в соответствии с которым он в зимогенном и протеиназном состоянии может существовать в альтернативной конформации, которая обеспечивает последовательное расщепление двух активационных связей в молекуле протеина [5, 38, 39]. Конформация зимогена является оптимальной для гидролиза связи в положении Arg 320, в то время как промежуточный продукт мезотромбин в протеиназной форме приобретает иную конформацию, обуславливающую расщепление связи в положении Arg 271. Основываясь на доказательстве роли проэкзосайта I в узнавании протромбина фактором Va и различной степени экспонирования экзосайта на зимогене и его протеиназных формах [19, 51–54], можно предполагать, что появление экзосайта I в мезотромбине может подготавливать субстрат для расщепления связи в положении Arg 271 [35, 36, 38].

Открытие мезотромбина как Na^+ -зависимого аллостерического энзима раскрывает новые подходы для регуляции его активности и специфичности. Впервые обнаружено, что своеобразная прокоагулянтная специфичность мезотромбина — активация факторов V и VIII, связанных с мембранами, и антикоагулянтная, обусловленная активацией протеина С в комплексе с тромбомодулином, регулируются Na^+ как эффектором каталитической функции энзима. Кроме того, Na^+ влияет на активность мезотромбина, увеличивая сродство экзосайта I к лигандам и направляя активацию протромбина на образование тромбина непосредственно из быстрой формы мезотромбина. Эта информация может быть использована для создания мутантных молекул с избирательной специфичностью к протеину С и моделирования активных участков ингибиторов тромбина.

Подобно тромбину, мезотромбин может выполнять две противоположные функции в процессе свертывания крови. Он может действовать как прокоагулянт, превращая фибриноген в нерастворимый фибрин, который удерживает тромбоциты в участке повреждения, способствуя первоначальным процессам заживления ран. Этот процесс, по-видимому, будет усиливаться активацией факторов V, VIII и XIII. Подобно тромбину, мезотромбин активирует протеин С, выполняя и антикоагулянтную функцию [63–66].

Известно, что связывание с тромбомодулином подавляет способность тромбина расщеплять фибриноген и PAR-1, но увеличивает более чем в 1 000 раз его специфичность по отношению к зимогену протеину С. Активированный протеин С гидролитически инактивирует факторы Va и VIIIa — основные кофакторы факторов Ха и IXa, необходимые для образования тромбина, тем самым подавляя оба (внешний и внутренний) пути свертывания крови. Кроме того, важные внутриклеточные реакции запускаются тромбином после расщепления рецепторов PAR-1 и PAR-4. Активация PAR-1 и PAR-4 тромбоцитов человека регулирует их активацию, агрегацию и высвобождение тромбоцитарных гранул.

Мы полагаем, что изучение механизма регуляции активности мезотромбина ионами натрия позволит получить дополнительные сведения о его физиологической функции. На основании данных о связывании Na^+ с тромбином при физиологических условиях можно утверждать, что более 50% мезотромбина будет находиться в связанном с Na^+ состоянии. Важно, что связывание Na^+ с энзимом необходимо для оптимального расщепления фибриногена, но не протеина С. Поэтому Na^+ -связанная форма мезотромбина ответственна за прокоагулянтную и, возможно, протромботическую и сигнальную функции, подобно тромбину. Вместе с тем Na^+ -свободная форма энзима является антикоагулянтной, поскольку проявляет активность к протеину С. Следовательно, степень насыщения ионами натрия этого промежуточного продукта активации протромбина обуславливает уровень его прокоагулянтной или антикоагулянтной активности. Прокоагулянтная функция Na^+ -связанной формы как тромбина, так и мезотромбина подтверждается данными о том, что генетические дефекты, вызывающие нарушение связывания Na^+ у протромбина Frankfurt, Salakta, Greenville, Scranton и др., сопровождаются кровотечениями. Интерес представляет то, что для антикоагулянтных мутантов как тромбина, так и мезотромбина, полученных в настоящее время, характерно нарушение в связывании Na^+ . Приведенные результаты подтверждают, что ионы Na^+ являются одним из регуляторов процесса свертывания крови. Изменение концентрации ионов натрия в плазме приводит к гипернатриемии $[\text{Na}^+] > 145$ или гипонатриемии $[\text{Na}^+] < 135$ mM и очень часто связано с тромбозами или кровотечениями, соответственно.

Следует отметить, что необходимы экспериментальные данные о структурных изменениях молекулы мезотромбина в Na^+ -связанной и Na^+ -свободной формах для объяснения механизма оптимизации прокоагулянтного действия мезотромбина ионами натрия.

Мезотромбин и мезотромбин des F1 являются активными лабильными интермедиатами, быстро переходящими в тромбин, что затрудняет исследование *in vitro* этих двух промежуточных форм протеина. В связи с этим для изучения структурно-функциональных особенностей мезотромбина был получен ряд стабильных мутантных форм MzT и MzT des F1, в частности рекомбинантный протромбин (rII) и две мутантные формы мезотромбина: rMzT (R155A, R271A, R284A) и rMzT des F1 (R271A, R284A). Исследование активации протеина С в присутствии рекомбинантного растворимого тромбомодулина показало, что тромбомодулинзависимая стимуляция активации протеина С перечисленными протеинами в присутствии фосфолипидных везикул была для rMzT в 6 раз более мощной, чем для rIIa. В присутствии тромбомодулина rMzT также оказался более эффективным активатором TAFI (ингибитора фибринолиза, активированного тромбином). Все три энзима способны вызывать агрегацию тромбоцитов, вместе с тем значительно более высокие концентрации rMzT и rMzT des F1 требуются для достижения эффекта тромбина. Константа ингибирования скорости реакции второго порядка ($\text{m}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) для rIIa, rMzT и rMzT des F1 антитромбином III составляет $2,44 \cdot 10^5$, $6,10 \cdot 10^4$ и $1,05 \cdot 10^5$. Ингибирование rMzT и rMzT des F1 антитромбином III не усиливается гепарином. Поэтому можно предположить, что фрагмент 2 в составе молекулы блокирует в протеиназном домене анионсвязывающий экзосайт 2, который, как показано для тромбина, взаимодействует с гепарином. Таким образом, фрагмент 2 rMzT и rMzT des F1 предотвращает образование тройного комплекса антитромбин III-протеиназа-гепарин, необходимого для эффективного ингибирования антитромбином III. Более низкая константа ингибирования rMzT антитромбином III предполагает, что мутантные формы энзима имеют более длительный период полужизни в циркулирующей крови по сравнению с тромбином и на их ингибирование не должен влиять гепарин. В отличие от последнего, все три формы энзима *in vivo* подобным образом ингибируются.

лись гирудином. Приведенные данные в некоторой степени обеспечивают понимание функциональной роли фрагмента 1 и двух потенциальных анионсвязывающих экзосайтов мезотромбина. Так, заметная стимуляция фосфолипидными везикулами тромбомодулинзависимой активации протеина С rMzT, но не rMzT des F1 или rPa четко указывает на значение Gla-домена для взаимодействия с фосфолипидами. Допуская, что rMzT, rMzT des F1 и rPa взаимодействуют с тромбомодулином подобным образом, можно полагать, что экзосайт 1 в молекуле этих энзимов находится в функционально активном состоянии.

Таким образом, установлено, что нативный мезотромбин, его мутантные формы и тромбин обладают прокоагулянтной, антикоагулянтной и антифибринолитической активностью. Последние две определяются зависимой от тромбомодулина активацией протеина С и ТАФИ, соответственно. Доказано, что тромбин и мезотромбин проявляют неравноценную прокоагулянтную и антикоагулянтную активность. Данные об активации фибриногена, тромбоцитов и ТАФИ мезотромбином показали, что он менее эффективен,

по сравнению с тромбином, в проявлении прокоагулянтной и антифибринолитической активности. Антикоагулянтная активность мезотромбина, т. е. активация протеина С, близка таковой тромбина и превышает ее в несколько раз в отсутствие и присутствии фосфолипидов соответственно. Можно полагать, что мезотромбин играет важную роль в контроле гемостаза, отличающуюся от роли тромбина. Наиболее существенно это проявляется в мелких сосудах вследствие высокой концентрации тромбомодулина. Таким образом, активация протромбина приводит к генерации двух энзимов с уникальными свойствами, каждый из которых является компонентом различных систем. Одна из них, в которой преобладает мезотромбин, — антикоагулянтная и профибринолитическая, хотя ее действие ограничено уровнем активного протеина С. Другая, с преобладающей генерацией тромбина, будет прокоагулянтной и антифибринолитической. Приведенные данные дают основания считать, что на стадии активации тромбина может происходить переключение его функциональной активности от антикоагулянтной и профибринолитической к прокоагулянтной и антифибринолитической.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mann K. G., Nesheim M. E., Church W. R. et al. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes // *Blood*. — 1990. — V. 76, N 1. — P. 1–16.
2. Rosing J., Zwaal R. F., Tans G. et al. Formation of meizothrombin as intermediate in Factor Xa-catalyzed prothrombin activation // *J. Biol. Chem.* — 1986. — V. 261, N 9. — P. 4224–4228.
3. Krishnaswamy S., Mann K. G., Nesheim M. E. The prothrombinase-catalyzed activation of prothrombin proceeds through the intermediate meizothrombin in an ordered, sequential reaction // *Ibid.* — V. 261, N 19. — P. 8977–8984.
4. Krishnaswamy S. Prothrombinase complex assembly. Contribution of protein-protein and protein-membrane interactions toward complex formation // *Ibid.* — 1990. — V. 265, N 7. — P. 3708–3718.
5. Krishnaswamy S. Exosite-driven substrate specificity and function in coagulation // *J. Thromb. Haemost.* — 2005. — V. 3, N 1. — P. 54–67.
6. Bianchini E. P., Orcutt S. J., Panizzi P. et al. Ratcheting of the substrate from the zymogen to proteinase conformations directs the sequential cleavage of prothrombin by prothrombinase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2005. — V. 102, N 29. — P. 10099–10104.
7. Boskovic D. S., Krishnaswamy S. Exosite binding tethers the macromolecular substrate to the prothrombinase complex and directs cleavage at two spatially distinct sites // *J. Biol. Chem.* — 2000. — V. 275, N 49. — P. 38561–38570.
8. Wilkens M., Krishnaswamy S. The contribution of Factor Xa to exosite-dependent substrate recognition by prothrombinase // *Ibid.* — 2002. — V. 277, N 11. — P. 9366–9374.
9. Orcutt S. J., Pietropaolo C., Krishnaswamy S. Extended interactions with prothrombinase enforce affinity and specificity for its macromolecular substrate // *Ibid.* — 2002. — V. 277, N 48. — P. 46191–46196.
10. Orcutt S. J., Krishnaswamy S. Binding of substrate in two conformations to human prothrombinase drives consecutive cleavage at two sites in prothrombin // *Ibid.* — 2004. — V. 279, N 52. — P. 54927–54936.
11. Bajzar L., Manuel R., Nesheim M. E. Purification and characterization of TAFI, a thrombin activable fibrinolysis Inhibitor // *Ibid.* — 1995. — V. 270, N 24. — P. 14477–14484.
12. Cote H. C. F., Bajzar L., Stevens W. K., Samis J. Functional characterization of recombinant human meizothrombin and Meizothrombin(desF1). Thrombomodulin-dependent activation of protein C and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), platelet aggregation, antithrombin-III inhibition // *Ibid.* — 1997. — V. 272, N 10. — P. 6194–6200.
13. Cote H. C. F., Stevens W. K., Bajzar L. et al. Characterization of a stable form of human

- meizothrombin derived from recombinant prothrombin (R155A, R271A and R284A) // *Ibid.* — 1994. — V. 269, N 15. — P. 11374–11380.
14. *Stevens W. K., Cote H. C. F., MacGillivray R. T. A., Nesheim M. E.* Calcium ion modulation of meizothrombin autolysis at Arg55–Asp56 and catalytic activity // *Ibid.* — 1996. — V. 271, N 14. — P. 8062–8067.
 15. *Brufatto N., Nesheim M. E.* Analysis of the kinetics of prothrombin activation and evidence that two equilibrating forms of prothrombinase are involved in the process // *Ibid.* — 2003. — V. 278, N 9. — P. 6755–6764.
 16. *Boskovic D. S., Bajzar L. S., Nesheim M. E.* Channeling during prothrombin activation // *Ibid.* — 2001. — V. 276, N 31. — P. 28686–28693.
 17. *Hortin G. L.* Sulfation of tyrosine residues in coagulation Factor V // *Blood.* — 1990. — V. 76, N 5. — P. 946–952.
 18. *Michnick D. A., Pittman D. D., Wise R. J., Kaufman R. J.* Identification of individual tyrosine sulfation sites within factor VIII required for optimal activity and efficient thrombin cleavage // *Ibid.* — 1994. — V. 269, N 31. — P. 20095–20102.
 19. *Anderson P. J., Nasset A., Dharmawardana K. R., Bock P. E.* Role of proexosite I in Factor Va-dependent substrate interactions of prothrombin activation // *J. Biol. Chem.* — 2000. — V. 275, N 22. — P. 16435–16442.
 20. *Boskovic D. S., Troxler T., Krishnaswamy S.* Active site-independent recognition of substrates and product by bovine prothrombinase: a fluorescence resonance energy transfer study // *Ibid.* — 2004. — V. 279, N 20. — P. 20786–20793.
 21. *Anderson P. J., Nasset A., Bock P. E.* Effects of activation peptide bond cleavage and fragment 2 interactions on the pathway of exosite I expression during activation of human prothrombin 1 to thrombin // *Ibid.* — 2003. — V. 278, N 45. — P. 44482–44488.
 22. *Anderson P. J., Bock P. E.* Role of prothrombin fragment 1 in the pathway of regulatory exosite I formation during conversion of human prothrombin to thrombin // *Ibid.* — 2003. — V. 278, N 45. — P. 44489–44495.
 23. *Chen L., Yang L., Rezaie A. R.* Proexosite-1 on prothrombin is a factor Va-dependent recognition site for the prothrombinase complex // *Ibid.* — 2003. — V. 278, N 30. — P. 27564–27569.
 24. *Beck D. O., Bukys M. A., Singh L. et al.* The contribution of amino acid region ASP695–TYR698 of factor V to procofactor activation and factor Va function // *Ibid.* — 2004. — V. 279, N 4. — P. 3084–3095.
 25. *Kamath P., Krishnaswamy S.* Fate of membrane-bound reactants and products during the activation of human prothrombin by prothrombinase // *Ibid.* — 2008. — V. 283, N 44. — P. 30164–30173.
 26. *Bukys M. A., Orban T., Kim P. Y. et al.* The interaction of fragment 1 of prothrombin with the membrane surface is a prerequisite for optimum expression of factor Va cofactor activity within prothrombinase // *J. Thromb. Haemost.* — 2008. — V. 99, N 3. — P. 511–522.
 27. *Bukys M. A., Orban T., Kim P. Y. et al.* The structural integrity of anion binding exosite I of thrombin is required and sufficient for timely cleavage and activation of factor V and factor VIII // *J. Biol. Chem.* — 2006. — V. 281, N 27 — P. 18569–18580.
 28. *Page M. J., Maegillivray R. T., Di Cera E.* Determinants of specificity in coagulation proteases // *J. Thromb. Haemost.* — 2005. — V. 3, N 11. — P. 2401–2408.
 29. *Huntington J. A.* Molecular recognition mechanisms of thrombin // *Ibid.* — 2005. — V. 3, N 8. — P. 1861–1872.
 30. *Bode W.* The structure of thrombin, a chameleon-like proteinase. // *Ibid.* — 2005. — V. 3, N 11. — P. 2379–2388.
 31. *Bode W.* Structure and interaction modes of thrombin // *Blood Cells Mol. Dis.* — 2006. — V. 36, N 2. — P. 122–130.
 32. *Gan Z-R., Li Y., Chen Z. et al.* Identification of basic amino acid residues in thrombin essential for heparin catalyzed inactivation by antithrombin III // *J. Biol. Chem.* — 1994. — V. 269, N 2. — P. 1301–1305.
 33. *Sheehan J. P., Saddler J. E.* Molecular mapping of the heparin-binding exosite of thrombin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1994. — V. 91, N 12. — P. 5518–5522.
 34. *Olson S. T., Bjosle J., Sheffer R., Craig P. A. et al.* Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement // *J. Biol. Chem.* — 1992. — V. 267, N 18. — P. 12528–12538.
 35. *Tans G., Nicolaes G. A., Thomassen M. C. et al.* Activation of human factor V by meizothrombin // *Ibid.* — 1994. — V. 269, N 23. — P. 15969–15972.
 36. *Di Cera E.* Thrombin: a paradigm for enzymes allosterically activated by monovalent cations // *C. R. Biol.* — 2004. — V. 327, N 12. — P. 1065–1076.
 37. *Di Cera E., Dang Q. D., Ayala Y. M.* Molecular mechanisms of thrombin function // *Cell Mol. Life Sci.* — 1997. — V. 53, N 9. — P. 701–730.
 38. *Wells C. M., Di Cera E.* Thrombin is a Na⁺-activated enzyme // *Biochemistry.* — 1992. — V. 31, N 47. — P. 11721–11730.
 39. *Pineda A. O., Carrel C. J., Bush I. et al.* Molecular dissection of Na⁺ binding to thrombin // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279, N 30. — P. 31842–31853.
 40. *Pineda A. O., Sovvides S. N., Waksman G., Di Cera E.* Crystall structure of the anticoagulant slow form of thrombin // *Ibid.* — 2002. — V. 277, N 43. — P. 40177–40180.
 41. *Колодзейская М. В., Волков Г. Л.* Ионы натрия как эфektor каталитического действия α-

- тромбина // Укр. біохім. журн. 2007. — Т. 79, № 1. — С. 5–21.
42. *Huntington J. A.* How Na⁺ activates thrombin — a review of the functional and structural data // *J. Biol. Chem.* — 2008. — V. 389, N 8. — P. 1025–1035.
43. *Prasad S., Cantwell A. M., Bush L. A. et al.* Asp-189 controls both substrate binding and the monovalent cation specificity of thrombin // *Ibid.* — 2004. — V. 279, N 11. — P. 10103–10108.
44. *Carrel C. J., Bush L. A., Mathews F. S., Di Cera E.* High resolution crystal structures of free thrombin in the presence of K (+) reveal the molecular basis of monovalent cation selectivity and an inactive slow form // *Biophys. Chem.* — 2006. — V. 121, N 3. — P. 177–184.
45. *Pineda A. O., Chen Z. W., Bah A. et al.* Crystal structure of thrombin in a self-inhibited conformation // *J. Biol. Chem.* — 2006. — V. 281, N 43. — P. 32922–32928.
46. *Lai M. T., Di Cera E., Shafer J. A.* Kinetic pathway for the slow to fast transition of thrombin // *Ibid.* — 1997. — V. 272, N 48. — P. 30275–30282.
47. *Bah A., Garvey I. C., Ge J., Di Cera E.* Rapid kinetics of Na⁺ binding to thrombin // *Ibid.* — 2006. — V. 281, N 52. — P. 40049–40056.
48. *Anderson P. J., Nasset A., Dharmawardana K. R., Bock P. E.* Characterization of proexosite I on prothrombin // *Ibid.* — 2000. — V. 275, N 22. — P. 16428–16434.
49. *Bock P. E., Olson S. T., Bjork I.* Inactivation of thrombin by antithrombin is accompanied by inactivation of regulatory exosite I // *Ibid.* — 1997. — V. 272, N 32. — P. 19837–19845.
50. *Bukys M. A., Kim P. Y., Nesheim M. E., Kalafatis M.* A control switch for prothrombinase: characterization of a hirudin-like pentapeptide from the COOH terminus of factor Va heavy chain that regulates the rate and pathway for prothrombin activation // *Ibid.* — 2006. — V. 281, N 51. — P. 39194–39204.
51. *Kroh H. K., Tans G., Nicolaes G. A. F. et al.* Expression of allosteric linkage between the sodium ion binding site and exosite I of thrombin during prothrombin activation // *Ibid.* — 2007. — V. 282, N 22. — P. 16095–16104.
52. *Dang O. D., Vindigni A., Di Cera E.* An allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — V. 92, N 13. — P. 5977–5981.
53. *Zhang E., Tulinsky A.* The molecular environment of the Na⁺ binding site of thrombin // *Biophys. Chem.* — 1997. — V. 63, N 2–3. — P. 185–200.
54. *Vijayalakshmi J., Padmanabhan K. P., Mann K. G., Tulinsky A.* The isomorphous structures of prethrombin-2, hirugen- and PPACK-thrombin changes accompanying activation and exosite binding to thrombin // *Protein Sci.* — 1994. — V. 3, N 12. — P. 2254–2271.
55. *Dharmawardana K. R., Olson S. T., Bock P. E.* Role of regulatory exosite I in binding of thrombin to human factor V, factor Va, factor Va subunits, and activation fragments // *J. Biol. Chem.* — 1999. — V. 274, N 26. — P. 18635–18643.
56. *Dharmawardana K. R., Bock P. E.* Demonstration of exosite I — dependent interactions of thrombin with human factor V and factor Va involving the factor Va heavy chain: analyses by affinity chromatography employing a novel method for active-site-selective immobilization of serine proteinases // *Biochemistry.* — 1998. — V. 37, N 38. — P. 13143–13152.
57. *Esmon C. T., Lollar P.* Involvement of thrombin anion-binding exosites 1 and 2 in the activation of Factor V and Factor VIII // *J. Biol. Chem.* — 1996. — V. 271, N 23. — P. 13882–13887.
58. *Myles T., Yun T. H., Hall S. W., Leung L. L.* An extensive interaction interface between thrombin and Factor V is required for Factor V activation // *Ibid.* — 2001. — V. 276, N 27. — P. 25143–25149.
59. *Guinto E. R., Di Cera E.* Large heat capacity change in a protein-monovalent cation interaction // *Biochemistry.* — 1996. — V. 35, N 27. — P. 8800–8804.
60. *Griffon N., Di Stasio E.* Thermodynamics of Na⁺ binding to coagulation serine proteases // *Biophys. Chem.* — 2001. — V. 90, N 1. — P. 89–96.
61. *Rezaie A. R., He X.* Sodium binding site of Factor Xa: role of sodium in the prothrombinase complex // *Biochemistry.* — 2000. — V. 39, N 7. — P. 1817–1825.
62. *Papaconstantinou M. E., Gandhi P. S., Chen Z. et al.* Na⁺ binding to meizothrombin des F1 // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2008. — V. 65, N 22. — P. 3688–3697.
63. *Cote H. C. F., Stevens W. K., Bajzar L. et al.* Characterization of stable form of human meizothrombin derived from recombinant prothrombin (R155A, R271A, and R284A) // *J. Biol. Chem.* — 1994. — V. 269, N 15. — P. 11374–11380.
64. *Cote H. C. F., Bajzar L., Stevens W. K. et al.* Functional characterization of recombinant human meizothrombin and meizothrombin (desF1). Thrombomodulin-dependent activation of protein C and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), platelet aggregation, antithrombin-III inhibition // *Ibid.* — 1997. — V. 272, N 10. — P. 6194–6200.
65. *Tans G., Nicolaes G. A., Thomassen M. C. et al.* Activation of human factor V by meizothrombin // *Ibid.* — 1994. — V. 269, N 23. — P. 15969–15972.
66. *Корольова Д. С., Чернищенко В. О., Горницька О. В., Платонова Т. М.* Вплив продуктів розщеплення протромбіну на активацію та агрегацію тромбоцитів // *Укр. біохім. журн.* — 2009. — Т. 81, № 5. — С. 58–65.

**МЕЗОТРОМБІН — ПОХІДНЕ
ПРОТРОМБІНУ — Na⁺-ЗАЛЕЖНИЙ
АЛОСТЕРИЧНИЙ ЕНЗИМ**

*М. В. Колодзейська
О. І. Юсова
Т. В. Гриненко*

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

E-mail: yusova07@mail.ru

Сучасний механізм активації протромбіну передбачає, що проензим і його активний інтермедіат мезотромбін існують в альтернативних конформаціях, які визначають послідовне розщеплення двох пептидних зв'язків у молекулі протромбіну, необхідних для його перетворення на тромбін. Конформація протромбіну є оптимальною для розщеплення зв'язку Arg 320-Ile321, тоді як мезотромбіну — Arg 271-Thr272.

Мезотромбін, на відміну від тромбіну, майже не виявляє прокоагулянтних властивостей, проте має підвищену антикоагулянтну активність, опосередковану тромбомодулінзалежною активацією протеїну С. Мезотромбін може регулювати фібринолітичний процес через тромбомодулінзалежну активацію інгібітора фібринолізу (TAFI).

Мезотромбін, як і тромбін, взаємодіє з фібриногеном, тромбомодуліном і протеїном С. Його специфічність залежить від зв'язування іонів натрію. Виявлено, що своєрідні прокоагулянтні властивості мезотромбіну — активація факторів V і VIII на мембранах та протикоагулянтні, зумовлені активацією зв'язаного з тромбомодуліном протеїну С, регулюються Na⁺ як ефектором його каталітичної функції. Крім того, Na⁺ впливає на активність мезотромбіну, збільшуючи афінність лігандів до екзосайту I і спрямовуючи активацію протромбіну на утворення тромбіну безпосередньо зі швидкої форми мезотромбіну. Визначення мезотромбіну як Na⁺-залежного алостеричного ензиму розкриває нові підходи для регуляції його активності та специфічності дії.

Ключові слова: протромбін, мезотромбін, фактор V зсідання крові, екзосайти I і II тромбіну, зв'язування Na⁺, алостерична регуляція.

**MEIZOTHROMBIN, NAMELY A DERIVATE
OF PROTHROMBIN, IS A Na⁺-DEPENDENT
ALLOSTERIC ENZYME**

*M. V. Kolodzeiskaia
E. I. Yusova
T. V. Grinenko*

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

E-mail: yusova07@mail.ru

According to modern conception concerning the mechanism of prothrombin activation, proenzyme and its intermediate form, meizothrombin exist in alternative conformations. The last ones determine splitting of two peptide bonds in the prothrombin molecule, that is necessary for its transformation into thrombin. Prothrombin conformation is optimal to split the bond Arg 320-Ile 321, while meizothrombin conformation is the most suitable to split Arg 271-Thr 272.

In contrast to thrombin, meizothrombin has ill-defined procoagulant properties and enhanced anticoagulant activity mediated by thrombomodulin-dependent activation of protein C. Meizothrombin can regulate fibrinolytic process through thrombomodulin-dependent activation of fibrinolysis inhibitor (TAFI)

Similar to thrombin, meizothrombin interacts with fibrinogen, thrombomodulin and protein C. Meizothrombin specificity depends on binding of sodium ions. It was found that specific procoagulant properties of meizothrombin (such as activation of factors V and VIII on the membrane surface) and anticoagulant ones, which are induced by the activation of protein C bound with thrombomodulin, can be regulated by Na⁺ as an effector of its catalytic function. Besides, Na⁺ influences on the meizothrombin activity by increasing affinity of ligands towards exosite I and by guidance of prothrombin activation, that leads to thrombin formation directly from the fast form of meizothrombin. Discovery of meizothrombin as Na⁺-dependent allosteric enzyme can reveal new approaches for regulation its activity and specificity.

Key words: prothrombin, meizothrombin, coagulation factor V, thrombin exosites I and II, Na⁺ binding, allosteric regulation.