

Характерные черты специфической ферментативной функции тромбина и их связь со структурой

А. А. Серейская

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины,
252660 Киев, ул. Мурманская, 1

В обзоре рассматриваются особенности структуры тромбина, связанные с высокой эффективностью и селективностью его физиологических функций.

Трипсиноподобная сериновая протеиназа тромбин является ключевым ферментом свертывания крови и в этой роли эффективно катализирует ограниченный протеолиз фибриногена и ряда других компонентов системы гемостаза. В то же время сравнение тромбина с трипсином *in vitro* по гидролизу моно- и дипептидных производных Arg и Lys, соответствующих первичной специфичности этих ферментов, показало, что собственно каталитический потенциал тромбина весьма невысок [1]. Однако в отношении гидролиза более протяженных Arg-субстратов тромбин оказался мощным катализатором, эффективность действия которого даже выше, чем в случае фибриногена [2]. То есть при взаимодействии с субстратами определенного типа (как с низко-, так и высокомолекулярными) возможно создание условий, усиливающих каталитический процесс. Это связано с тем, что, в отличие от трипсина, тромбин принадлежит к ферментам, для которых очень важны множественные контакты с субстратом [3]. Очевидно, многоточечное связывание с субстратом облегчает образование продуктивного фермент-субстратного комплекса, увеличивает вероятность наиболее благоприятной для катализа ориентации расщепляемой связи в каталитической щели и посредством тонких конформационных изменений повышает эффективность работы каталитического аппарата [4].

Чтобы аргументировать это положение, рассмотрим особенности структуры активного центра, участков связывания тромбина и взаимодействия его с субстратами различных типов. Для этого привлечем данные субстратно-ингибиторного и рентгеноструктурного анализа (РСА) тромбина [5—7] и используем их при исследовании основных функциональных участков фермента с помощью его атомно-молекулярной модели [8—10].

Тромбин представляет собой почти сферическую молекулу, размеры ее $45 \times 45 \times 50 \text{ \AA}^3$. Короткая А-цепь не отделена пространственно от длинной каталитической В-цепи, а как бы оплетает глобулу последней. Так же, как у родственных панкреатических протеиназ, аналогом которых является В-цепь, посредине глобулы проходит впадина, разделяющая ее на две части (домены). Тромбин отличается от трипсина и химотрипсина тем, что у него эта впадина резче выражена, глубже заходит в толщу молекулы, ее точнее назвать расщелиной. По модели рассчитаны размеры расщелины: глубина

12—15, ширина 6—7, высота 22 Å, она расширяется книзу. При образовании фермент-субстратного комплекса в эту расщелину попадает расщепляемая связь с соседними к ней остатками субстрата, т. е. ее можно считать полостью активного центра. Стенки полости сформированы как линейными, так и петлевыми сегментами Б-цепи. Слева (с «севера», по обозначениям PCA [5]) в стенку включены Arg173 — Ile174, основания петлевых сегментов Asn95 — Leu99, Phe34 — Cys42, справа (с «юга») — петлевые сегменты Gly216 — Cys220, Asn143 — Gln151. Петлевые сегменты выступают над поверхностью стенок, образуют выросты, выпячивания, направленные в глубь полости. При этом наиболее экспонированными в глубине полости оказываются гидрофобные радикалы. Это боковые цепи Ile174, Trp60A, Pro60C, Trp60D, Phe60H, Thr147, Trp148 и др. Среди них преобладают уникальные для тромбина остатки 9-членной вставки (в сравнении с трипсином и химотрипсином, на что указывает буквенный индекс при нумерации по последовательности химотрипсиногена). Гидрофобные остатки образуют своеобразную полость — гидрофобную клетку, являющуюся важной архитектурной особенностью («мотивом», по современной терминологии) молекулы тромбина. Гидрофобная клетка пересекает полость активного центра, в одних участках сливаясь с ее стенками, в других — ограничивая ее объем (внутреннее пространство).

Боковые радикалы заряженных остатков располагаются на дне и ближе к верхнему концу полости активного центра (Glu217, Glu192, Asn143, Gln151, Arg73).

Пространство между остатками Asp102, His57, Ser195, составляющими каталитическую триаду, представляет собой каталитическую щель, где размещается фермент-субстратный тетраэдрический комплекс и происходит собственно каталитический акт. Остатки каталитической триады находятся в консервативных по первичной последовательности областях тромбина, что отражает принципиальное сходство механизма катализа тромбина с другими сериновыми протеиназами.

Интересно отметить локализацию остатков каталитической триады по разные стороны расщелины активного центра: Asp102, His57 принадлежат левому домену Б-цепи, Ser195 — правому. То же относится к трипсину и химотрипсину. Но поскольку у этих ферментов щель активного центра не так глубока, как у тромбина, каталитические остатки их лучше ориентированы друг относительно друга. По данным моделирования [8], расстояние $N^{\Delta 1} \text{His57} - O^{\Delta 1} \text{Asp102}$ у тромбина (3,4 Å) больше, чем у трипсина и химотрипсина (2,6 Å) [11], а имидазольное кольцо остатка His немного повернуто вокруг оси и поэтому находится не в оптимальной ориентации относительно γ -атома активного серина (не компланарно ему). Кроме того, нависающие над каталитической щелью слева и справа массивные индольные радикалы Trp60D и, особенно, Trp148 мешают входу и точному размещению расщепляемой связи в каталитической щели. Эти особенности геометрии каталитического центра тромбина, а также увеличение расстояния между элементами триады, возможно, вызывают некоторые затруднения в образовании водородных связей при функционировании релейной системы переноса заряда, что может сказаться на скорости каталитического этапа, снизить его каталитический потенциал. Вероятно, вследствие этого тромбин оказывается слабым катализатором при гидролизе простых субстратов типа ArgOMe, TAMe, BAMe [2].

В правой стенке полости активного центра между остатками Ser195 (сверху) и Ser214 (снизу) находится проем, ведущий в карман первичного связывания. Его узкий извилистый ход сложнее по форме и более протяжен, чем у трипсина, глубина его примерно 7 Å. Нижнюю (левую) стенку кармана составляет пептидный скелет остатков Ser214 — Trp215 — Gly216,

отделяющий его от полости активного центра. Сверху карман прикрывает нависающий над ним дисульфидный мостик Cys42 — Cys58. Дно кармана формируют остатки Gly219 — Cys220, Asp189. Карбоксильная группа Asp189 ($O^{\Delta -}$) является противоионом, реагирующим с гуанидиновым радикалом Arg или Lys (P1 субстрата), чем определяется первичная специфичность тромбина и трипсина. Фиксация субстрата в первичном кармане у тромбина хуже, чем у трипсина. В нем способна разместиться лишь гуанидиновая часть боковой цепи Arg, а углеводородная часть выступает из кармана и не фиксируется. Ионные взаимодействия с Asp189 у тромбина, возможно, ослаблены из-за близости положительно заряженной вставки Arg187 — Gly188. Такое строение кармана недостаточно благоприятно для фиксации расщепляемой связи в составе фермент-субстратного комплекса. Метилэфир Arg, который связывается с тромбином только по первичному карману, гидролизует им намного хуже, чем трипсином. В силу изложенных обстоятельств не все соответствующие первичной специфичности тромбина субстраты являются субстратами эффективными, поскольку неадекватны особенностям строения, отличающим специфичность высшего порядка. Вовлечение в процесс гидролиза новых участков молекулы тромбина, ответственных за вторичную и третичную (супер)специфичность, представляет собой компенсаторный механизм, повышающий каталитический потенциал тромбина до уровня не ниже трипсинового [3, 4, 12].

Остановимся на деталях строения вторичной и третичной контактных зон тромбина. При этом следует иметь в виду, что а) субцентры фермента ($S_1 - S_n$), взаимодействующие с конкретным аминокислотным остатком субстрата, могут быть как сформированы из нескольких остатков, так и один и тот же остаток может быть включен в разные субцентры; б) в литературе нет единой терминологии по данному вопросу, кроме понятия «субцентр», вводят термин «карман» (первичного связывания, дистальный, проксимальный), «арилсвязывающий» центр. Однако намечается некое различие в этих терминах: $S_1 \dots S_n$ относится ко взаимодействию с главной пептидной цепью субстрата, а в «карман» входят боковые группы.

Главная цепь субстрата ($P_1 - P_3$) огибает стенку кармана первичного связывания и располагается почти параллельно боковому радикалу P1 (Arg), входящему в карман. При этом она образует антипараллельный складчатый лист с S1 — S3 тромбина (Ser214 — Trp215 — Gly216). Субцентр S1, взаимодействующий с P1 субстрата, имеет сложное строение. N- и O-атомы основной цепи Arg образуют водородные связи с Ser214, Gly193, Ser195 и имидазольным кольцом His57. Гуанидиновый остаток Arg, находясь в кармане, формирует солевой мостик с Asp189 и водородную связь с Gly219.

Субцентр S2 также непосредственно примыкает к каталитической триаде. Размеры S2 ограничены, он оптимален для связывания небольших и средних гидрофобных остатков. Начинается он с имидазольного кольца активного His57, которое таким образом включается в его структуру. В центре S2 находится Trp215, вместе с P2 субстрата участвующий в формировании β -листа. Для реализации такой конформации необходимо, чтобы остаток в P2 субстрата был способен к изгибу и имел бы не слишком большие размеры, иначе возникнут неблагоприятные контакты со стенкой кармана. Последнее может отрицательно сказаться на эффективности катализа. Этому условию удовлетворяют остатки Pro или Gly. По сравнению с ними Val в P2 менее эффективен, хотя именно Val занимает эту позицию в фибриногене; вероятно, вследствие этого имитирующие участок фибриногена с Val в P2 олигопептиды расщепляются тромбином *in vitro* намного хуже, чем некоторые природные субстраты с Pro в P2 (например, гастрин-релизинг фактор [13]). Слева и спереди S2 ограничивают остатки Tyr60A

и Trp60D. Снизу располагается Leu99, отделяющий субцентр S2 от S3.

В качестве S3 субцентра выступает Gly216, дающий две водородные связи с P3 субстрата, участвуя таким образом в формировании антипараллельного β -листа. S2 и S3 находятся по разные стороны щели активного центра. Со стороны S2 между ними создается еще углубление: D-дистальный [14] или арилсвязывающий [15] карман, образованный стенкой S2 и боковыми радикалами остатков, формирующих гидрофобную клетку — Trp215, Leu99, Tyr60A, Trp60D, Ile174. Полость этого кармана по объему соответствует бензолному ядру. Субцентр S2 вместе с арилсвязывающим карманом составляют аполярный, вторичный связывающий (суб)центр, являющийся важнейшей структурной и функциональной особенностью тромбина. Оригинальность этой структуры подчеркивается тем, что в ее формировании участвуют остатки петли Tyr — Pro — Pro — Trp (60A — D) — уникальной для тромбина 9-членной вставки.

Следует отметить своеобразную стереоспецифичность аполярного центра [16]. Если в положении P2 замена L-остатка на D приводит к тому, что субстрат перестает гидролизироваться, то в P3 D-конфигурация предпочтительнее. Поэтому D-Phe-Pro-Arg-pNA(CH₂Cl), имеющий в P3 объемный гидрофобный остаток в D-конфигурации, относится к лучшим субстратам (ингибиторам) тромбина.

Необходимым условием правильного размещения гидрофобного остатка в арилсвязывающей полости является локализация его под определенным углом к P1 (субстрата или ингибитора), занимающего S1-первичный карман связывания. Это обеспечивается присутствием в P2 Pro или Gly, благодаря изгибу пептидной цепи направляющих гуанидин Arg в первичный карман, причем D-Val в P2 как бы «выбивает» его оттуда. Таким образом, можно представить себе положение, при котором начальная хорошая подгонка по аполярному центру приводит затем к наиболее точному размещению радикала P1 в первичном кармане [17].

Гидрофобный карман D субсайта S3 и субсайт S2 близко подходят к остаткам каталитической триады активного центра. Вероятно, адекватное заполнение их остатками P2 и P3 субстрата вызывает некое смещение в сторону каталитического центра, следствием которого будет приобретение более активной конформации, а также усиление системы переноса заряда. Например, если N^{E2} His57 и O γ Ser195 находятся слишком далеко друг от друга для образования водородной связи, то смещение (поворот) плоскости имидазольного кольца His может исправить эту ситуацию. То же самое в отношении взаимной ориентации His57 и Asp102. Таким образом, воздействие на каталитическую триаду слева (снизу) от расщепляемой связи при продуктивном комплексообразовании с субстратом по вторичной зоне способно усилить каталитический потенциал активного центра. По-видимому, кроме гидролиза искусственных синтетических субстратов, этот механизм срабатывает при расщеплении тромбином ряда белковых (полипептидных) субстратов, соответствующих его вторичной специфичности, т. е. с Pro в P2 и гидрофобным остатком в P3.

Но центральный субстрат тромбина в системе свертывания крови фибриноген не удовлетворяет требованиям вторичной специфичности тромбина. У него в P2 стоит Val, не обеспечивающий необходимого изгиба цепи и этим затрудняющий гидрофобные контакты в D-кармане (S3). Положение несколько улучшает L-Phe в позиции P9, так как поворот цепи за счет кластера глицинов (P3 — P5) приближает его к S3 — S4-элементам гидрофобной клетки [7, 15]. Однако, как показывает модель (РСА [7]), этот Phe не попадает полностью в полость арилсвязывающего субцентра фермента, и если вызывает какие-то конформационные изменения в нужном направлении, то они еще недостаточны для повышения каталитической

активности до уровня, соответствующего гидролизу интактного фибриногена, протяженных фрагментов его А α -цепи (1—44, 1—51) или синтетических трипептидных субстратов.

В случае протеолиза тромбином фибриногена и некоторых других его физиологических субстратов срабатывает механизм третичной (супер)специфичности, в котором определяющими становятся взаимодействия между ферментом и субстратом вне зоны активного центра и участка расщепляемой связи [18—20].

Дополнительные участки взаимодействия тромбина со специфическими высокомолекулярными лигандами формируются с помощью кластеров положительно заряженных остатков, значительная часть которых сосредоточена в β - и γ -петлевых выступах поверхности Б-цепи. β -Петля 67—81 (на модели сверху справа) топологически подобна Са-связывающей петле панкреатических сериновых протеиназ [21], но приобретает у тромбина особую функцию — участвует в процессе рекогниции. Не менее важна γ -петля 145—150, она включает вставку 149А-Е и располагается ниже β -петли недалеко от щели активного центра.

Будучи связанными с глобулой только у основания, β - и γ -петли выступают над ее поверхностью, довольно подвижны, не имеют жесткой пространственной структуры. В то же время для β -петли допускают наличие солевых мостиков между разноименно заряженными остатками Arg67 — Glu80, Glu80 — Lys70, Lys70 — Glu77 [21], что придает ей определенную форму.

β -Петля вместе с прилегающими к ней остатками γ -петли и пространственно близкими одиночными положительно заряженными остатками Arg35, Lys36, Lys109, Lys110 составляют дополнительный центр (ДЦ) узнавания — связывания высокомолекулярных субстратов тромбина. Катионную природу ДЦ и внешнее в отношении активного центра положение отражает его синонимическое название АВЕ — анионсвязывающий экзосайт. АВЕ 1 ответствен за взаимодействие с фибриногеном [22] (отсюда еще одно наименование: FRS-сайт рекогниции фибриногена), фибрином, тромбомодулином, гирудином, рецептором тромбина на тромбоцитах, кофактором гепарина 2. Расстояние от ДЦ до кармана связывания (каталитического Ser195) оценивается в 18—20 Å.

Кроме АВЕ 1, существует еще АВЕ 2, который служит для связывания гепарина [23]. Располагается он на противоположной стороне поверхности глобулы Б-цепи.

Сложная пространственная структура АВЕ 1, в создании которой, помимо электростатических, очевидно, участвуют и гидрофобные силы, необходима для продуктивного контакта со специфическими высокомолекулярными лигандами. При разрушении дополнительного центра (например, у β - или γ -тромбина) резко уменьшается или совсем теряется способность тромбина свертывать фибриноген и выполнять некоторые другие биологические функции, хотя каталитическая активность по отношению к низкомолекулярным субстратам сохраняется [24]. В частности, к такому результату приводит нарушение структуры β -петли при расщеплении связей Ile68 — Arg77А или Arg77А — Asn78 (β -тромбин) [25], а также вследствие мутации Квик1 [26]: Arg67 \rightarrow Cys, препятствующей формированию солевого мостика между концами петли.

Для эффективного протеолиза фибриногена необходимо узнавание — связывание ДЦ с комплементарным ему участком субстрата (КС), удаленным от расщепляемой связи. На фибриногене он расположен в сегменте 33 — 51 А α -цепи [27, 28]. Показано, что α -тромбин гораздо эффективнее, чем γ -тромбин, отщепляет фибринопептид (FPA) А α -цепи. Но разница между ними исчезает и скорость гидролиза α -тромбина снижается до уровня

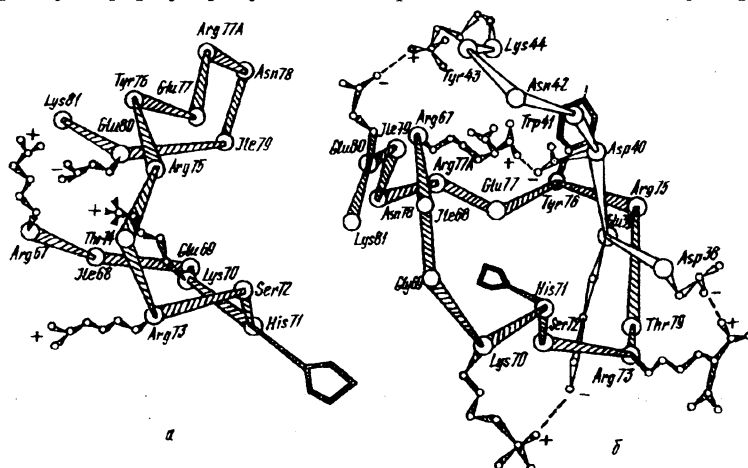
γ -тромбина при нарушении участка КС (А α 34—51) [29].

Взаимодействие между ДЦ и КС непосредственно не затрагивает каталитического центра тромбина. Поэтому синтетический пептид, имитирующий последовательность 27—50 А α -цепи фибриногена, ингибирует свертывание и отщепление FPA, но не подавляет катализа специфического низкомолекулярного субстрата, как показано при гидролизе Gly — Pro — Arg — pNA [30].

Дополнительный центр и комплементарный сайт субстрата составляют аппарат третичной (супер)специфичности тромбина [19]. Необходимость предварительного узнавания — связывания специфического субстрата по ДЦ не снижает важности связывания его в первичном кармане активного центра. Это дало повод говорить о мостиковом связывании (bridge-binding), как о характерной черте тромбина [31].

С помощью модели тромбина был проведен конформационный анализ комплекса, образующегося при контакте ДЦ с КС фибриногена [10]. Рассчитаны топологические и энергетические параметры системы. Показано, что комплексообразованию не препятствуют какие-либо существенные стерические затруднения. Значительный вклад в формирование комплекса принадлежит электростатическому притяжению. Уменьшение свободной энергии за счет последнего составляет 45 ккал/моль, т. е. достаточно для образования энергетически выгодного комплекса тромбина и фибриногена вне области активного центра. Связывание фибриногена с тромбином сопровождается потерей энтропии, следовательно, предполагает некую степень жесткости или возникновение напряжения. Напряжение появляется в результате сочетания благоприятных и неблагоприятных электростатических контактов. Для комплекса рекогниции фибриноген — тромбин электростатические силы являются определяющими, в отличие от комплекса с гирудином, для которого также характерно мостиковое связывание, но гидрофобные контакты не менее важны, чем электростатические [32].

Образование комплекса КС — ДЦ сопровождается изменением конформации его компонентов, что хорошо видно при сравнении компьютерных изображений свободной β -петли и в составе комплекса (рисунок). Интактный ДЦ (β -домен) имел вид изогнутой (искривленной) петли, верхняя и нижняя ветви которой располагаются одна под другой, а изгиб направлен вперед. В результате взаимодействия с фибриногеном петля разогнулась, повернулась приблизительно на 90 градусов и приобрела винтообразную форму (рисунок, б). При этом наибольшие пространствен-



Структура β -петли дополнительного центра тромбина в свободном ферменте (а) и в комплексе с КС фибриногена (б) (участок цепи тромбина заштрихован)

ные изменения коснулись положения атомов в участке, находящемся на изгибе петли (Arg73 — Glu77), гораздо меньше смещены остатки возле ее основания (Arg67 — Gly69, Ile79 — Lys81). Боковые радикалы остатков, вокруг $\text{C}\alpha$ -атомов которых происходило вращение при разгибании и повороте петли, изменили свое направление. Так, боковой радикал Lys70 и имидазольное кольцо His71 повернулись вокруг оси примерно на 180 градусов. Эти данные означают, что взаимодействие ДЦ тромбина с его специфическим субстратом фибриногеном связано с конформационными изменениями.

Проанализированы пространственные соотношения между остатками ДЦ и КС в комплексе [10]. Расстояния между их заряженными боковыми группами позволяют говорить об образовании четырех водородно(-солевых) связей. Донорные и акцепторные группы, входящие в эти ионные пары, и расстояния между ними приведены в табл. 1.

Таблица 1
Образование водородных связей в комплексе ДЦ — КС

Фибриноген	Тромбин	Расстояние, Å
OD1 Asp38	NH1 Arg73	2,0
OE1 Glu39	NZ Lys70	2,2
OD1 Asp40	NH1 Arg67	2,1
NZ Lys44	OE1 Glu80	2,2

Сближение обоих лигандов в результате связывания их дальнедействующими солевыми мостиками делает возможным гидрофобные и иного рода ближние взаимодействия. Весьма вероятно участие в подобных взаимодействиях со стороны тромбина Thr74, Tyr76 β -петли и Trp148 γ -петли, со стороны фибриногена — Asn42, Tyr43, Trp33. В частности, относительно Trp33 фибриногена, расположенного на границе КС, показано, что модификация его приводит к резкому снижению скорости гидролиза α -тромбином, но не отражается на действии γ -формы [27, 29].

На вероятность изменения локализации Trp148 при образовании комплекса рекогниции указывают следующие данные.

1. По РСА, наибольшие различия в структуре комплексов тромбина с низкомолекулярными (РРАСК [5]) и высокомолекулярными (гирудин) специфическими ингибиторами приходятся на область γ -петли Glu146 — Gly150, разница по положению атома $\text{C}\alpha$ Trp148 между комплексами составляет 6,3 Å [33]. В комплексе с РРАСК Trp148 расположен близко от активного центра, своим объемным радикалом прикрывает его щель, а в комплексе с гирудином петля 146—150 расположена несколько иначе: окружает и сдвигает индольный радикал Trp [33]. Поскольку РРАСК с ДЦ не реагирует, то очевидно, что эта область в комплексе с ДЦ тромбина соответствует свободному ферменту, тогда как гирудин в данном случае выступает аналогом фибриногена (комплекс с гирудином близок к таковому с фибриногеном). Это значит, что связывание по ДЦ меняет конформацию γ -петли и, возможно, отодвигает Trp148 от каталитической щели.

2. Связывание специфического лиганда (С-концевого пептида гирудина) в ДЦ защищает γ -петлю от протеолиза (химотрипсином, эластазой) и сопровождается увеличением удельной флюоресценции, скорее всего, из-за смещения остатка Trp γ -петли [34]. По мнению авторов, это свидетельствует об аллостерическом взаимодействии, которое сопрягает (couple) активный центр с γ -петлей.

Возможность конформационных изменений в γ -петле и активном центре в итоге связывания с экзосайтом (ДЦ) специфического участка тромбинового рецептора тромбоцитов, сходного с КС фибриногена, отмечена при кристаллографическом исследовании их комплекса [35]. Вследствие образования комплекса ДЦ — КС, очевидно, происходит переориентация заряженных групп, водородных и гидрофобных связей из района контакта КС фибриногена и ДЦ тромбина на другие (внутримолекулярные) области фермента.

Как волна по упругой поверхности, конформационные изменения могут распространяться от β -петли на γ -петлю, а затем и на активный центр. Такому индукционному процессу способствуют уже упомянутые особенности строения β - и γ -петель, их относительная подвижность, отсутствие жесткой вторичной структуры (они связаны со всей глобулой только у основания, остальная же часть их выступает над поверхностью).

Образование комплекса ДЦ — КС инициирует специфическое (оптимальное) расположение фибриногена относительно тромбина. В итоге взаимодействия (узнавания — связывания) ДЦ — КС и последующих конформационных изменений цепь фибриногена в участке расщепляемой связи должна занять в молекуле тромбина положение, которое отличается от исходного в свободном ферменте, но в области активного центра соответствует конфигурации, создаваемой при связывании упомянутых выше адекватных по вторичной специфичности лигандов.

Таким образом, за счет укладки цепи специфического субстрата справа происходят благоприятные для катализа изменения в области активного центра, гидролиз фибриногена может идти так же эффективно, как и соответствующих вторичной специфичности низкомолекулярных (трипептидных) субстратов.

Конкретно пока что представляются вероятными три пути сопряжения активного центра с дополнительным в результате образования комплекса рекогниции.

1. Переключение каталитического механизма с однопротонного на двухпротонный в результате смещения какого-либо остатка в направлении активного Ser195, что дает ему возможность принять на себя функцию дополнительного (по отношению к His57) донора — акцептора системы переноса заряда. На основании опытов с тромбином, модифицированным по гистидину (не тождественному His57), предположили [36], что в ДЦ входит остаток His, который образует ионную пару с близлежащим ароматическим остатком в свободном ферменте. При взаимодействии со специфическим субстратом эта пара распадается, и освобождающийся His вовлекается в сферу активного центра. Судя по модели, такую роль мог бы сыграть His71 β -петли. Таким образом, однопротонный механизм становится двухпротонным, при этом усиливается эффективность системы переноса заряда.

2. Изменение конформации, смещение какого-либо остатка каталитической триады (например, поворот плоскости имидазольного кольца His57), которое сокращает расстояние между каталитическими остатками, что повышает вероятность завязывания соответствующих водородных связей в системе переноса заряда.

3. Отодвигание, смещение остатков, затрудняющих (частично заслоняющих) вход в щель активного центра, например Trp148. Как указывалось выше, этот остаток Trp располагается в γ -петле и может быть оттянут в результате прямого гидрофобного контакта с ароматическими остатками КС фибриногена или перераспределения водородных связей в ДЦ с участием ароматических остатков Trp β -петли.

Помимо приведенных выше данных РСА о появлении конформационных изменений в результате связывания по ДЦ, в пользу гипотезы о

сопряжении ДЦ и активного центра в результате образования комплекса рекогниции со специфическим субстратом свидетельствуют и кинетические эксперименты.

Модификации тромбина, избирательно снижающие его свертывающую активность, т. е. разрушающие ДЦ, в большей мере снижают каталитический этап реакции отщепления FPA (по k_{cat}), чем образование комплекса Михаэлиса (по $1/K_M$). Подобные модификации могут быть вызваны ограниченным протеолизом (образование несвертывающих форм β -, γ -Тр), природными и геноинженерными мутациями, химическими воздействиями (табл. 2). Это доказывает, что дело не просто в увеличении мест связывания, а и в воздействии на каталитический центр.

Таблица 2

Влияние модификаций на свертывание фибриногена и отщепление фибринопептида А тромбином (кинетические параметры)

Модификация	Нативный, k_{cat}/K_M , $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	Модифицированный		Отношение нативный/модифицированный		Литературный источник
		Свертывающая активность, %	k_{cat}/K_M , $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	k_{cat}	$1/K_M$	
β -тромбин	9	2—5	0,12	40	2	[25]
Мутация в ДЦ по Arg66	13	1,2	0,16	13	6	[26]
Модифици- рованный Тур (в ДЦ)	3,1	10	0,9	3,5	1	[37]
Делеция 60В—60D (ProProTtr)	5,4	3	0,1	51	1	[38]

Тромбин (его Б-цепь), как можно видеть на модели, подобно другим сериновым протеиназам состоит из двух основных доменов. По гипотезе же Дуфтона [39], для трипсиноподобных сериновых протеиназ характерно движение этих двух доменов относительно друг друга, что аллостерически вызывает изменение конформации, способствующее ускорению расщепления чувствительной связи. В случае гидролиза специфических высокомолекулярных субстратов тромбином такое смещение доменов происходит вследствие контакта ДЦ и КС справа от каталитического центра. Но можно представить себе и благоприятные изменения в активном (каталитическом) центре в результате взаимодействия слева от него между аполярным центром и специфическим низкомолекулярным субстратом (вторичная специфичность). При этом повышение эффективности работы каталитического аппарата в большей мере зависит от улучшения связывания, чем от усиления каталитического этапа. На это указывает преимущественное снижение $1/K_M$ при нарушении аполярного центра.

Так, при гидролизе D-Phe-Pip-Arg-pNA нарушение S2 и/или арилсвязывающего центра выражается в 16-кратном уменьшении этой величины, тогда как k_{cat} практически не меняется [38].

В смысле усиления каталитического действия оба способа воздействия, вероятно, подобны. Но принципиальная разница между ними та, что при реализации третичной специфичности определенная автономность, изолированность ДЦ и КС от активного центра и участка расщепляемой связи удлиняют и усложняют путь индукционного воздействия, сужая круг субстратов и, следовательно, делая его более селективным, подходящим для целей биорегуляции.

В заключение выражаю благодарность С. В. Пелтановой за помощь в оформлении рукописи.

A. O. Sereyska

Характерні риси специфічної ферментативної функції тромбіна та їх зв'язок із структурою

Резюме

В огляді наведено відомості щодо особливостей структури тромбіна, які впливають на високу селективність та ефективність його дії у системі згортання крові. Розглядається значення додаткового екзосайту влізання — зв'язування ферменту у взаємодії з фібриногеном. Обговорюється можливість виникнення конформаційних змін внаслідок утворення комплексу фібриноген — тромбін, що спричинює прискорення каталітичного процесу.

A. A. Sereyskaya

Characteristic features of specific fermentative function of thrombin and it's connection with the structure

Summary

This review deals with thrombin peculiarities responsible for its highly selective and effective action in blood clotting system. Role of enzyme additional binding-recognition exosites in interaction with fibrinogen is analyzed. As a result of thrombin-fibrinogen recognition complex formation it is supposed some conformational changes to arise that couple exosite with active centre and accelerate the catalytic process.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hartley B. S.* The active centers of serine proteinases // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*—1974.—227.—P.438—445.
2. *Isquierdo C., Burguillo F. J.* Synthetic substrates for thrombin // *Int. J. Biochem.*—1989.—21, N 6.—P.579—592.
3. *Серебряный С. Б.* Тромбин, его строение и особенности катализа // *Биохимия и физиология животных и человека.*—1982.—№ 6.—С. 14—26.
4. *Sereyskaya A. A., Karabut L. V., Shchekhin I. E.* On the efficiency and selectivity of thrombin catalysis // *Thrombosis Res.*—1994.—74, N 5.—P. 549—550.
5. *Bode W., Mayr I., Baumann U. et al.* Refined 1,9 Å crystal structure of human α -thrombin // *EMBO J.*—1989.—8.—P. 3467—3475.
6. *Stubbs M. T., Oschkinat H., Mayr I. et al.* The interaction of thrombin with fibrinogen. A structural basis for its specificity // *Eur. J. Biochem.*—1992.—206.—P. 187—195.
7. *Martin P. D., Robertson W., Turk D. et al.* The structure of residues 7—16 of the α -chain of human fibrinogen bound to bovine thrombin at 2.3 Å resolution // *J. Biol. Chem.*—1992.—267, N 11.—P. 7911—7920.
8. *Серейская А. А., Карабут Л. В., Смирнова И. В., Щечкин И. Е.* О взаимодействии дополнительного центра тромбина с комплементарным сайтом фибрингена // *Докл. АН Украины.*—1991.—№ 11.—С. 140—143.
9. *Карабут Л. В., Серейская А. А.* Особенности строения контактной зоны тромбина. Возможные механизмы взаимодействия его с низко- и высокомолекулярными субстратами // *Биополимеры и клетка.*—1992.—8, № 5.—С. 31—35.
10. *Карабут Л. В., Щечкин И. Е., Серейская А. А.* Моделирование комплекса рекогниции фибриногена тромбином // *Там же.*—1994.—10, № 6.—С. 80—84.
11. *Tsukada H., Blow D. M.* Structure of α -chymotrypsin refined at 1.68 Å resolution // *J. Mol. Biol.*—1985.—184, N 9.—P. 703—711.
12. *Кибирев В. К., Серейская А. А.* Структурные основы специфичности тромбина // *Биохимия животных и человека.*—1989.—Вып. 13.—С. 10—18.
13. *Chang J. Y.* Thrombin specificity. Requirement for apolar aminoacids... // *Eur. J. Biochem.*—1985.—151, N 2.—P. 217—224.
14. *Banner D. W., Hadvary P.* Crystallographic analysis at 3.0 Å resolution of the binding to human thrombin of four active site-directed inhibitor // *J. Biol. Chem.*—1991.—266, N 30.—P. 20085—20093.
15. *Bode W., Turk D., Sturzebecher J.* Geometry, X-ray crystallographic determination of NAPAP-trypsin complex a. modelling of NAPAP-thrombin a. MQPA-thrombin // *Eur. J. Biochem.*—1990.—193, N 1.—P. 175—182.
16. *Пояркова С. А., Кибирев В. К., Серебряный С. Б.* Исследование ингибиторного действия

- метиловых эфиров аргининсодержащих олигопептидов на тромбин и трипсин // Укр. биохим. журн.—1987.—59, № 5.—С. 5—11.
17. Пояркова С. А., Кибирев В. К., Серебряный С. Б. Ингибирование протеолитической активности тромбина метиловыми эфирами аргининсодержащих олигопептидов // Там же.—1986.—58, № 6.—С. 3—8.
 18. Magnusson S., Petersen T. E. Proteases a. biological control // Conf. on cell proliferation: Abstr.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1975.—Vol 2.—P. 123—149.
 19. Серейская А. А. О суперспецифичности тромбина // Молекуляр. биология.—1980.—Вып. 27.—С. 68—79.
 20. Fenton J. W. Thrombin specificity // Ann. N. Y. Acad. Sci.—1981.—370.—P. 468—495.
 21. Karshikov A., Bode W. Electrostatic properties of thrombin: importance for structural stabilization and ligand binding // Sem. Thromb. Hemost.—1993.—19, N 4.—P. 334—343.
 22. Fenton J. W., Olsson T., Zabinski M. et al. Anion-binding exosite of human α -thrombin and fibrin(ogen) recognition // Biochemistry.—1988.—27, N 18.—P. 7106—7112.
 23. Whinna H. C., Church F. C. Interaction of thrombin with AT, heparin cofactor 2, and protein C inhibitor // J. Prot. Chem.—1993.—12, N 6.—P. 677—688.
 24. Seegers W., Hassouna H., Walz G. et al. Prothrombin and thrombin. Selected aspects of thrombin formation, properties, inhibition and immunology // Sem. Thromb. Hemost.—1975.—1.—P. 211—283.
 25. Hofsteenge J., Braun P. J., Stone S. R. Enzymatic properties of proteolytic derivatives of human α -thrombin // Biochemistry.—1988.—27, N 6.—P. 2144—2151.
 26. Henriksen R. A., Mann K. G. Identification of primary structural defect in dysthrombin Quick I // Ibid.—N 26.—P. 9161—9165.
 27. Hogg D. H., Blomback B. Mechanism of fibrinogen-fibrinogen reaction // Thromb. Res.—1978.—12.—P. 953—964.
 28. Scheraga H. A. Chemical basis of thrombin interactions with fibrinogen // Ann. N. Y. Acad. Sci.—1986.—485.—P. 124—133.
 29. Серейская А. А., Смирнова И. В., Карабут Л. В., Четыркина С. Н. Критическая роль взаимодействия анионсвязывающего дополнительного центра тромбина с комплементарным ему участком A α -цепи фибриногена для проявления высокой специфичности фермента // Биохимия.—1994.—59, № 3.—С. 360—367.
 30. Binne C. G., Lord S. T. A synthetic analog of fibrinogen α -27—50 is an inhibitor of thrombin // Thromb. Haemost.—1991.—65.—P. 165—168.
 31. Maraganore J. M., Bourdon P., Jablonski J. et al. Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent inhibitors of thrombin // Biochemistry.—1990.—29.—P. 7095—7101.
 32. Hopfner K.-P., Ayala Y., Szewchuk Z. et al. Chemical compensation in macromolecular bridge-binding to thrombin // Ibid.—1993.—32, N 12.—P. 2947—2953.
 33. Rydel T. J., Tulinsky A., Bode W., Huber R. Refined structure of hirudin-thrombin-complex // J. Mol. Biol.—1991.—221.—P. 583—601.
 34. Parry M. A., Stone S. R., Hofsteenge J., Jackman M. P. Evidence for common structural changes in thrombin induced by active site or exosite binding // Biochem. J.—1993.—290.—P. 665—670.
 35. Mathews I. I., Padmanabhan K. P., Ganesh V. et al. Crystallographic structures of thrombin complexed with thrombin receptor peptides // Biochemistry.—1994.—33, N 11.—P. 3266—3279.
 36. Church F. C., Lundblad R. L., Noyes C. M. Modification of histidines in human prothrombin // J. Biol. Chem.—1985.—260, N 8.—P. 4936—4940.
 37. Lundblad R. L., Noyes C. M., Featherstone C. L. et al. Reaction of bovine α -thrombin with tetranitromethane // Ibid.—1988.—263, N 8.—P. 3279—3734.
 38. Le Bonniec B. F., Guinto E. R., MacGillivray R. T. A. et al. Role of thrombins Tyr-Pro-Pro-Trp motif in interaction with fibrinogen, thrombomodulin, protein C, AT and Kunitz inhibitors // Ibid.—1993.—268, N 26.—P. 19055—19061.
 39. Dufton M. J. Could domain movements be involved in mechanism of trypsin-like serine proteases? // FEBS Lett.—1990.—271, N 12.—P. 9—13.