



# Estudios de estructura y función de las interacciones de la trombina con sustratos fisiológicos

Erick Adolfo Hernández Carvajal

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Universidad de Barcelona  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**ESTUDIOS DE ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS INTERACCIONES DE LA  
TROMBINA CON SUSTRATOS FISIOLÓGICOS**

Tesis de Doctorado

Erick Adolfo Hernández Carvajal  
Barcelona, 2013



Universidad de Barcelona  
Facultad de Biología  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Programa de Doctorado en Biomedicina 2009/2010  
Espacio Europeo de Educación Superior

## **ESTUDIOS DE ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS INTERACCIONES DE LA TROMBINA CON SUSTRATOS FISIOLÓGICOS**

Memoria presentada por Erick Adolfo Hernández Carvajal  
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona  
Institut d'Investigació Biomèdica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Erick Adolfo Hernández Carvajal  
Doctorando

Dr. Pablo Fuentes Prior  
Director de la tesis

Dra. Eva Estébanez Perpiñá  
Tutora de la tesis







## ABREVIATURAS



---

|                        |                                                                                                                                                               |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Å:</b>              | Angstrom                                                                                                                                                      |
| <b>ACN:</b>            | Acetonitrilo                                                                                                                                                  |
| <b>ADN:</b>            | Ácido desoxirribonucleico                                                                                                                                     |
| <b>APC:</b>            | Proteína C activada                                                                                                                                           |
| <b>AT:</b>             | Antitrombina                                                                                                                                                  |
| <b>BMRB:</b>           | Base de datos de Resonancia Magnética (del inglés, <i>Biological Magnetic Resonance Data Bank</i> ); ( <a href="http://www.bmrwisc.edu">www.bmrwisc.edu</a> ) |
| <b>BSA:</b>            | Albúmina de suero bovino (del inglés, <i>bovine serum albumin</i> )                                                                                           |
| <b>CARA:</b>           | Programa para la asignación de resonancias asistido por computador (del inglés, <i>Computer-aided resonance assignment</i> )                                  |
| <b>CCP4:</b>           | Programa para el análisis de datos de cristalografía por rayos X de macromoléculas (del inglés, <i>Collaborative computational project No. 4</i> )            |
| <b>CERM:</b>           | Centro de Resonancia Magnética, Universidad de Florencia, Italia (del italiano, <i>Centro di Risonanze Magnetiche</i> )                                       |
| <b>CON:</b>            | Experimento de correlación heteronuclear carbono-nitrógeno                                                                                                    |
| <b>COOT:</b>           | Programa para el procesamiento y modelado de estructuras 3D de macromoléculas (del inglés, <i>Crystallographic object-oriented toolkit</i> )                  |
| <b>C-terminal:</b>     | Carboxi-terminal                                                                                                                                              |
| <b>DSC:</b>            | Calorimetría diferencial de barrido (del inglés, <i>differential scanning calorimetry</i> )                                                                   |
| <b>DSF:</b>            | Fluorimetría diferencial de barrido (del inglés, <i>differential scanning fluorimetry</i> )                                                                   |
| <b>DTT:</b>            | Ditiotreitol                                                                                                                                                  |
| <b><i>E. coli:</i></b> | <i>Escherichia coli</i>                                                                                                                                       |
| <b>ECV:</b>            | Enfermedad cardiovascular                                                                                                                                     |
| <b>EGF:</b>            | Factor de crecimiento epidérmico (del inglés, <i>epidermal growth factor</i> )                                                                                |
| <b>EPCR:</b>           | Receptor endotelial de la proteína C (del inglés, <i>endothelial protein C receptor</i> )                                                                     |
| <b>ESRF:</b>           | <i>European Synchrotron Radiation Facility</i>                                                                                                                |
| <b>Fbg:</b>            | Fibrinógeno                                                                                                                                                   |
| <b>Fbn:</b>            | Fibrina                                                                                                                                                       |
| <b>FPLC:</b>           | Cromatografía líquida de proteínas (del inglés, <i>fast protein liquid chromatography</i> )                                                                   |
| <b>FPR:</b>            | D-Phe-Pro-Arg-clorometilcetona, o FPR-clorometilcetona, o PPACK                                                                                               |
| <b>FSAP:</b>           | Proteasa activadora del factor VII (del inglés, <i>factor VII activator protease</i> )                                                                        |
| <b>FV-FXIII:</b>       | Factores V-XIII de la cascada de coagulación. FVa-FXIIIa se refieren a las formas activas                                                                     |
| <b>FVIIIa1:</b>        | Conector interdominios A1-A2 del factor VIII                                                                                                                  |
| <b>FVIIIa2:</b>        | Conector interdominios A2-B del factor VIII                                                                                                                   |
| <b>FVIIIa3:</b>        | Conector interdominios B-A3 del factor VIII                                                                                                                   |
| <b>Gla:</b>            | Dominio rico en residuos de $\gamma$ -carboxiglutamato                                                                                                        |

---

|                             |                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>GP Ib-IX-V:</b>          | Receptor de membrana presente en plaquetas formado por las glicoproteínas Ib, IX y V                                                                                                                                                |
| <b>GPCR:</b>                | Receptor de transmembrana acoplado a proteínas G (del inglés, <i>protein coupled receptors</i> )                                                                                                                                    |
| <b>HAMSTeRS:</b>            | Dase de datos de mutaciones, estructura y ensayos asociados a la Hemofilia A (del inglés, <i>The haemophilia A mutation, structure, test and resource site</i> ); ( <a href="http://www.hadb.org.uk/">http://www.hadb.org.uk/</a> ) |
| <b>HCII:</b>                | Cofactor II de la heparina (del inglés, <i>heparin cofactor II</i> )                                                                                                                                                                |
| <b>Hir-C:</b>               | Cola C-terminal de la hirudina (Gly <sup>54</sup> -Gln <sup>65</sup> ) con la Tyr <sup>63</sup> sulfatada                                                                                                                           |
| <b>HRP:</b>                 | Peroxidasa de rábano (del inglés, <i>horseradish peroxidase</i> )                                                                                                                                                                   |
| <b>HSQC:</b>                | Experimento de correlación heteronuclear protón-nitrógeno (del inglés, <i>heteronuclear single quantum correlation</i> )                                                                                                            |
| <b>IPTG:</b>                | Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido                                                                                                                                                                                                |
| <b>ITC:</b>                 | Calorimetría isothermal de titulación (del inglés, <i>isothermal titration calorimetry</i> )                                                                                                                                        |
| <b>K1:</b>                  | Dominio tipo <i>kringle</i>                                                                                                                                                                                                         |
| <b>LB:</b>                  | Medio de cultivo Luria-Bertani para células bacterianas                                                                                                                                                                             |
| <b>LBS-1:</b>               | Sitio de unión de ligando-1 en el receptor PAR1 (del inglés, <i>ligand binding site-1</i> )                                                                                                                                         |
| <b>LRR:</b>                 | Región rica en leucinas (del inglés, <i>leucine rich region</i> )                                                                                                                                                                   |
| <b>MALDI-TOF:</b>           | Desorción/ionización láser asistida por matriz (del inglés, <i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i> ).                                                                                                    |
| <b>MS:</b>                  | Espectrometría de masas (del inglés, <i>mass spectrometry</i> )                                                                                                                                                                     |
| <b>Ni-NTA:</b>              | Níquel-ácido nitrilotriacético (del inglés, <i>nickel-nitrilotriacetic acid</i> ). Matriz de agarosa derivatizada con ácido nitrilotriacético cargada de iones Ni <sup>2+</sup>                                                     |
| <b>N-terminal:</b>          | Amino-terminal                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>PAR:</b>                 | Receptor activado por proteasa (del inglés, <i>protease-activated receptors</i> )                                                                                                                                                   |
| <b>PAR1:</b>                | Receptor activado por proteasa-1 (del inglés, <i>protease-activated receptor-1</i> )                                                                                                                                                |
| <b>PAR1<sup>ecto</sup>:</b> | Ectodominio del receptor activado por proteasa-1                                                                                                                                                                                    |
| <b>PAR1<sub>L</sub>:</b>    | PAR1 <sub>Long</sub> , variante del dominio extracelular de PAR1 (que consta de los residuos 37-102)                                                                                                                                |
| <b>PAR1<sub>S</sub>:</b>    | PAR1 <sub>Short</sub> , variante del dominio extracelular de PAR1 (que consta de los residuos 42-102)                                                                                                                               |
| <b>PC:</b>                  | Proteína C                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>PCI:</b>                 | Inhibidor de la proteína C (del inglés, <i>protein C inhibitor</i> )                                                                                                                                                                |
| <b>PCR:</b>                 | Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>polymerase chain reaction</i> )                                                                                                                                                 |
| <b>PDB:</b>                 | Base de datos de proteínas (del inglés, <i>Protein Data Bank</i> )                                                                                                                                                                  |
| <b>PMSF:</b>                | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés, <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> )                                                                                                                                                 |
| <b>PNI:</b>                 | Proteasa nexina I                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>PS:</b>                  | Proteína S                                                                                                                                                                                                                          |

|                       |                                                                                                                                                      |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PVDF:</b>          | Fluoruro de polivilideno (del inglés, <i>polyvinylidene fluoride</i> )                                                                               |
| <b>RMN:</b>           | Resonancia magnética nuclear                                                                                                                         |
| <b>RX:</b>            | Rayos X                                                                                                                                              |
| <b>SC:</b>            | Estafiloagulasas (del inglés, <i>staphylocoagulase</i> )                                                                                             |
| <b>SDS-PAGE:</b>      | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (del inglés, <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> ) |
| <b>SP:</b>            | Proteasa serínica (del inglés, <i>serine protease</i> )                                                                                              |
| <b>TAFI:</b>          | Inhibidor de la fibrinólisis activado por la trombina (del inglés, <i>thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor</i> )                              |
| <b>TCEP:</b>          | Tris-2-carboxietil fosfina (del inglés, <i>tris(2-carboxyethyl)phosphine</i> )                                                                       |
| <b>TF:</b>            | Factor tisular (del inglés, <i>tissue factor</i> )                                                                                                   |
| <b>TFPI:</b>          | Inhibidor de la vía del factor tisular (del inglés, <i>tissue factor pathway inhibitor</i> )                                                         |
| <b>T<sub>m</sub>:</b> | Temperatura de desnaturalización                                                                                                                     |
| <b>TM:</b>            | Trombomodulina                                                                                                                                       |
| <b>tPA:</b>           | Activador de plasminógeno tisular (del inglés, <i>tissue-type plasminogen activator</i> )                                                            |
| <b>TS:</b>            | Factor tisular (del inglés, <i>tissue factor</i> )                                                                                                   |
| <b>vWF:</b>           | Factor de von Willebrand                                                                                                                             |
| <b>X:</b>             | Cualquiera de los 20 aminoácidos                                                                                                                     |





## ÍNDICE





**ABREVIATURAS**

|                                                                        |             |
|------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>ÍNDICE</b>                                                          | <b>i</b>    |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>                                                | <b>ix</b>   |
| <b>LISTA DE TABLAS</b>                                                 | <b>xvii</b> |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>                                                 | <b>1</b>    |
| <b>1.1 LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES</b>                           | <b>3</b>    |
| <b>1.2 HEMOSTASIA</b>                                                  | <b>5</b>    |
| <b>1.3 LA CASCADA DE COAGULACIÓN</b>                                   | <b>7</b>    |
| <b>1.4 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA TROMBINA</b>                         | <b>12</b>   |
| 1.4.1 Estructura de la proteinasa                                      | 12          |
| 1.4.2 Sustratos más relevantes                                         | 16          |
| 1.4.3 Regulación de la actividad                                       | 18          |
| 1.4.4 Dinamismo conformacional y plasticidad                           | 19          |
| <b>1.5 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS FACTORES V y VIII</b>               | <b>20</b>   |
| 1.5.1 Estructura de los factores V y VIII                              | 20          |
| 1.5.2 Mecanismo de activación                                          | 22          |
| 1.5.3 Función procoagulante de los factores Va y VIIIa                 | 24          |
| 1.5.4 Enfermedades asociadas con deficiencias en los factores VIII y V | 27          |
| 1.5.4.1 Hemofilia A                                                    | 27          |
| 1.5.4.2 Enfermedad de von Willebrand                                   | 28          |
| 1.5.4.3 Parahemofilia o enfermedad de Owren                            | 28          |
| 1.5.4.4 Resistencia a la APC congénita y variante FV <sub>LEIDEN</sub> | 29          |

|                                                                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.6 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR PROTEASAS (PARs)</b>                                                | <b>30</b> |
| 1.6.1 Estructura de los receptores PARs                                                                                         | 30        |
| 1.6.2 Mecanismo de activación del receptor PAR1                                                                                 | 31        |
| 1.6.3 Función procoagulante de PAR1                                                                                             | 33        |
| 1.6.4 Respuesta inflamatoria mediada por PAR1                                                                                   | 33        |
| <b>1.7 INTERACCIONES MEDIADAS POR LOS EXOSITOS DE LA TROMBINA</b>                                                               | <b>34</b> |
| 1.7.1 Interacciones con receptores                                                                                              | 35        |
| 1.7.1.1 El receptor endotelial, la trombomodulina                                                                               | 35        |
| 1.7.1.2 Glicoproteína de plaquetas GP Ib-IX-V                                                                                   | 36        |
| 1.7.2 El activador de la protrombina de <i>Staphylococcus aureus</i> , la estafilocoagulasa                                     | 37        |
| 1.7.3 Interacciones con inhibidores                                                                                             | 39        |
| 1.7.3.1 Hirudina y hemadina                                                                                                     | 39        |
| 1.7.3.2 Otros inhibidores derivados de animales hematófagos                                                                     | 41        |
| 1.7.3.3 Heparina                                                                                                                | 42        |
| 1.7.4 Reconocimiento de sustratos fisiológicos                                                                                  | 43        |
| 1.7.4.1 Reconocimiento del fibrinógeno                                                                                          | 43        |
| 1.7.4.2 Activación del factor V                                                                                                 | 44        |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                                                                             | <b>49</b> |
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                                                                                  | <b>53</b> |
| <b>3.1 MATERIALES Y PREPARACIONES ESPECÍFICAS</b>                                                                               | <b>55</b> |
| 3.1.1 Preparación de variantes de trombina unida a diferentes ligandos                                                          | 55        |
| <b>3.2 ANÁLISIS BIOQUÍMICOS Y BIOFÍSICOS DE LA TROMBINA</b>                                                                     | <b>56</b> |
| 3.2.1 Digestión enzimática de la trombina                                                                                       | 56        |
| 3.2.2 Ensayos de microcalorimetría diferencial ( <i>Differential Scanning Calorimetry</i> , DSC)                                | 57        |
| 3.2.3 Ensayos de termofluorescencia diferencial ( <i>ThermoFluor</i> ®)                                                         | 58        |
| <b>3.3 EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LOS FRAGMENTOS FVIIIa1, FVIIIa2, FVIIIa3 Y DE LAS VARIANTES DEL DOMINIO EXTRACELULAR DE PAR1</b> | <b>59</b> |
| 3.3.1 Características esenciales de las cepas de <i>Escherichia coli</i> empleadas                                              | 60        |

|                                                                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.2 Plásmidos de expresión                                                                                                             | 60        |
| 3.3.3 Transformación de células competentes                                                                                              | 61        |
| 3.3.4 Precultivos y obtención de glicerolados                                                                                            | 62        |
| 3.3.5 Expresión a gran escala                                                                                                            | 62        |
| 3.3.5.1 Expresión a gran escala en medio mínimo para el marcaje con $^{13}\text{C}$ y $^{15}\text{N}$ del fragmento recombinante FVIIIa1 | 63        |
| <b>3.4 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA</b>                                                                                                          | <b>64</b> |
| 3.4.1 Secuenciación del ADN                                                                                                              | 66        |
| <b>3.5. PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS RECOMBINANES DEL FVIII Y DE PAR1</b>                                                              | <b>66</b> |
| 3.5.1 Lisis celular                                                                                                                      | 66        |
| 3.5.1.1 Lisis por congelación/descongelación                                                                                             | 67        |
| 3.5.1.2 Lisis química con detergentes                                                                                                    | 67        |
| 3.5.2 Purificación por cromatografía de afinidad                                                                                         | 67        |
| 3.5.2.1 Purificación en batch utilizando resina de afinidad Ni-NTA agarosa                                                               | 68        |
| 3.5.2.2 Purificación mediante cromatografía FPLC de afinidad                                                                             | 69        |
| <b>3.6 ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS PURIFICADAS</b>                                                                                         | <b>70</b> |
| 3.6.1 Digestión enzimática y análisis por espectrometría de masas                                                                        | 70        |
| 3.6.2 Determinación de la concentración de proteínas                                                                                     | 70        |
| 3.6.3 Electroforesis de proteínas                                                                                                        | 72        |
| 3.6.3.1 Electroforesis en geles desnaturizantes de SDS-poliacrilamida                                                                    | 72        |
| 3.6.3.2 Electroforesis en geles nativos de poliácridamida y experimentos de desplazamiento de banda ( <i>band shift</i> )                | 73        |
| 3.6.3.3 Tinción de los geles                                                                                                             | 74        |
| 3.6.4 Inmunodetección de proteínas ( <i>Western blotting</i> )                                                                           | 75        |
| <b>3.7 CRISTALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES</b>                                                               | <b>77</b> |
| 3.7.1 Preparación de complejos para la cristalización                                                                                    | 77        |
| 3.7.2 Búsqueda de condiciones de cristalización y crecimiento de los cristales                                                           | 78        |
| 3.7.2.1 Técnicas de mejora de cristales                                                                                                  | 79        |
| 3.7.2.1.1 Técnicas previas al crecimiento                                                                                                | 80        |
| 3.7.2.1.2 Técnicas posteriores al crecimiento                                                                                            | 82        |

|                                                                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.7.3 Recogida de los cristales y criopreservación                                                                                   | 82        |
| 3.7.4 Recogida de los datos de difracción                                                                                            | 83        |
| 3.7.5 Procesamiento de los datos de difracción: integración y reducción de datos                                                     | 85        |
| 3.7.6 Resolución de las estructuras cristalinas                                                                                      | 86        |
| 3.7.6.1 Cálculo de los mapas de densidad electrónica y refinamiento de la estructura                                                 | 87        |
| 3.7.7 Publicación de la estructura                                                                                                   | 89        |
| <b>3.8 ESTUDIOS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DEL FRAGMENTO FVIIIa1</b>                                                            | <b>89</b> |
| 3.8.1 Materiales                                                                                                                     | 90        |
| 3.8.2 Experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN)                                                                             | 90        |
| 3.8.2.1 Experimentos para la asignación de las resonancias mediante protón ( $^1\text{H}$ ) y carbono ( $^{13}\text{C}$ )            | 91        |
| <b>4. RESULTADOS</b>                                                                                                                 | <b>93</b> |
| <b>4.1 LIGANDOS ESPECÍFICOS DEL SITIO ACTIVO Y DEL EXOSITIO I MODULAN LA ESTABILIDAD Y PLASTICIDAD DE LA TROMBINA</b>                | <b>95</b> |
| 4.1.1 La ocupación del sitio activo de la trombina reduce la accesibilidad del lazo 70-80 a la endoproteinasa Arg-C                  | 96        |
| 4.1.2 Estabilidad térmica de la trombina en presencia de ligandos que se unen al sitio activo o al exosito I                         | 97        |
| 4.1.3 Análisis de la estabilidad térmica de la trombina mediante termofluorescencia diferencial                                      | 99        |
| 4.1.4 Evidencia cristalográfica de la plasticidad de la trombina                                                                     | 101       |
| 4.1.4.1 Comparación del exosito I y II y del sitio activo en estructuras monoméricas de trombina libre e inhibida con FPR            | 101       |
| 4.1.4.2 Resolución de estructuras de trombina libre y trombina-FPR no descritas previamente en la literatura                         | 105       |
| 4.1.4.2.1 Tetramero de trombina-FPR perteneciente al grupo espacial $P2_1$ , con dimensiones de celda: 66.5; 124.2; 75.5 (93.8)      | 105       |
| 4.1.4.2.2 Tetramero de trombina-FPR perteneciente al grupo espacial $P2_1$ , con dimensiones de celda: 89.41; 77.49; 126.29 (109.96) | 108       |

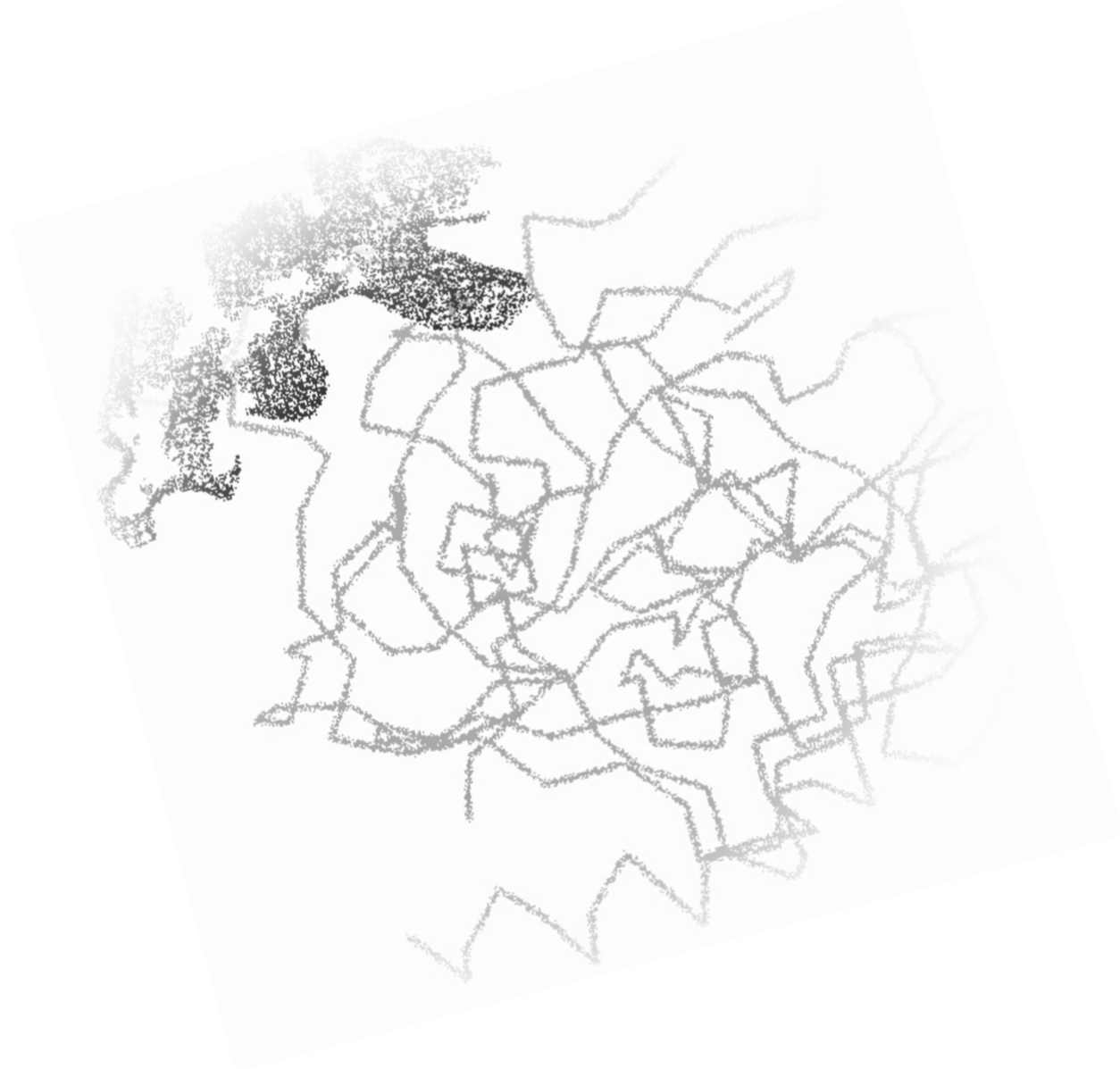
|                                                                                                                                                             |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.1.4.2.3 Tetrámero de trombina libre perteneciente al grupo espacial P2 <sub>1</sub> , con dimensiones de celda: 66.14; 146.44; 68.01 (94.2)               | 111        |
| 4.1.4.2.4 Dímero de trombina libre perteneciente al grupo espacial C222 <sub>1</sub> , con dimensiones de celda: 90.65; 95.92; 145.54 (90.0)                | 113        |
| <b>4.2 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA ACTIVACIÓN DEL FVIII Y DE PAR1</b>                                                                                        | <b>115</b> |
| 4.2.1 Expresión heteróloga de los conectores interdominios FVIIIa1 (330-372), FVIIIa2 (712-740) y FVIIIa3 (1649-1689)                                       | 115        |
| 4.2.1.1 Sobreexpresión del fragmento FVIIIa1                                                                                                                | 116        |
| 4.2.1.2 Extracción y purificación del fragmento FVIIIa1                                                                                                     | 117        |
| 4.2.1.3 Comprobación de la secuencia del conector FVIIIa1 mediante digestión con endoproteinasa Asp-N.                                                      | 119        |
| 4.2.1.4 Sobreexpresión y purificación del conector FVIIIa1 para los estudios de resonancia magnética nuclear: marcaje con <sup>15</sup> N y <sup>13</sup> C | 120        |
| 4.2.1.5 Expresión recombinante del fragmento FVIIIa2                                                                                                        | 121        |
| 4.2.1.6 Purificación del fragmento FVIIIa2                                                                                                                  | 122        |
| 4.2.1.7 Sobreexpresión y purificación del fragmento FVIIIa3                                                                                                 | 123        |
| 4.2.1.8 Comprobación de la secuencia del fragmento FVIIIa3 mediante espectrometría de masas                                                                 | 124        |
| 4.2.2 Expresión heteróloga de las variantes del dominio extracelular de PAR1, PAR1 <sub>L</sub> (37-102) y PAR1 <sub>S</sub> (42-102)                       | 125        |
| 4.2.2.1 Sobreexpresión y extracción de la variante PAR1 (37-102) del dominio extracelular de PAR1                                                           | 126        |
| 4.2.2.2 Purificación de la variante PAR1 (37-102)                                                                                                           | 127        |
| 4.2.2.3 Sobreexpresión y purificación de la variante PAR1 (42-102) del dominio extracelular de PAR1                                                         | 127        |
| 4.2.3 Estudios preliminares de la formación de complejos trombina-sustrato mediante experimentos de desplazamiento de banda ( <i>band shift</i> )           | 129        |
| 4.2.4 Búsqueda de condiciones de cristalización de complejos entre la trombina y los conectores del FVIII y el dominio extracelular de PAR1                 | 131        |
| 4.2.4.1 Cristalización de la trombina en su complejo con la variante del dominio extracelular PAR1 <sub>L</sub> (R42Q)                                      | 133        |

|                                                                                                                                                                                                |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2.4.2 El dominio extracelular de PAR1 interacciona con la trombina a través de su región semejante a la hirudina, Lys <sup>51</sup> -Glu <sup>57</sup>                                       | 133        |
| 4.2.5 Análisis de la interacción del conector FVIIIa1 con la trombina y el factor X mediante resonancia magnética nuclear                                                                      | 138        |
| 4.2.5.1 Estudios preliminares de la interacción entre el fragmento recombinante FVIIIa1- <sup>15</sup> N con la trombina mediante resonancia magnética nuclear                                 | 138        |
| 4.2.5.2 Efecto de la ocupación del sitio activo o del exosito I en la interacción entre el FVIIIa1- <sup>15</sup> N con la trombina                                                            | 141        |
| 4.2.5.3 Asignación de las resonancias del fragmento recombinante FVIIIa1 libre y en complejo con la trombina mediante experimentos de triple resonancia a través de protón                     | 144        |
| 4.2.5.4 Confirmación de la asignación de las resonancias del fragmento recombinante FVIIIa1 libre y en complejo con la trombina mediante experimentos de triple resonancia a través de carbono | 148        |
| <b>5. DISCUSIÓN</b>                                                                                                                                                                            | <b>153</b> |
| <b>5.1 ESTRUCTURA DE LA TROMBINA ES MODULADA POR LIGANDOS ESPECÍFICOS DEL SITIO ACTIVO Y DEL EXOSITIO I</b>                                                                                    | <b>155</b> |
| 5.1.1 La estabilidad térmica de la trombina aumenta significativamente en presencia de ligandos unidos al sitio activo o al exosito I                                                          | 155        |
| 5.1.2 La ocupación del sitio activo de la trombina incrementa la estabilidad del exosito I a proteólisis limitada                                                                              | 159        |
| 5.1.3 Evidencia cristalográfica de la conexión sitio activo-exosito I: reducción de la flexibilidad del lazo 70-80 de la trombina inhibida con FPR                                             | 163        |
| 5.1.4 Evidencia del dinamismo conformacional de la trombina modulado por sus ligandos                                                                                                          | 164        |
| <b>5.2 BASES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN DE LA TROMBINA CON SUS SUSTRATOS</b>                                                                                                                | <b>165</b> |
| 5.2.1 Bases moleculares de la interacción del receptor PAR1 con su proteasa activadora, la trombina                                                                                            | 165        |
| 5.2.1.1 Sobreexpresión de variantes del dominio extracelular de PAR1                                                                                                                           | 167        |

|                                                                                                                                                                 |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.2.1.2 La región del dominio extracelular de PAR1 semejante al extremo C-terminal de la hirudina interacciona con el exosito I de la trombina                  | 168        |
| 5.2.2 Bases moleculares de la interacción del FVIII con su proteasa activadora, la trombina                                                                     | 171        |
| 5.2.2.1 Estrategias para determinar las bases moleculares de la interacción del FVIII con la trombina: RMN de proteínas en solución y cristalografía de rayos X | 171        |
| 5.2.2.1.1 Sobreexpresión de los conectores ácidos interdominios del FVIII                                                                                       | 171        |
| 5.2.2.1.2 Búsqueda de condiciones de cristalización de los conectores FVIIIa1 y FVIIIa3 unidos a la trombina                                                    | 173        |
| 5.2.2.2 Estudio de las bases moleculares de la interacción del conector FVIIIa1 humano con la trombina y el FX mediante RMN                                     | 174        |
| 5.2.2.2.1 Identificación de la región Glu <sup>331</sup> -Asp <sup>349</sup> del conector FVIIIa1 como sitio de interacción con la trombina                     | 175        |
| 5.2.2.2.2 Mecanismo de activación del FVIII humano mediado por la trombina                                                                                      | 180        |
| 5.2.2.2.3 Modelo de activación del FVIII                                                                                                                        | 183        |
| 5.2.2.2.4 Estudio de la interacción del conector FVIIa1 con el factor X mediante RMN                                                                            | 185        |
| <b>6. CONCLUSIONES</b>                                                                                                                                          | <b>187</b> |
| <b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>                                                                                                                                          | <b>191</b> |
| <b>8. ANEXOS</b>                                                                                                                                                | <b>211</b> |
| <b>Anexo 1: Estructuras 3D de trombina reportadas</b>                                                                                                           | <b>213</b> |
| <b>Anexo 2: Estructura y clasificación de los aminoácidos</b>                                                                                                   | <b>221</b> |
| <b>Anexo 3: Alineamientos de las secuencias de los Factores V y VIII</b>                                                                                        | <b>223</b> |
| <b>Anexo 4: Mapa del vector de clonación</b>                                                                                                                    | <b>233</b> |
| <b>Anexo 5: Tampones y disoluciones</b>                                                                                                                         | <b>235</b> |
| <b>Anexo 6: Formulación de soluciones de cristalización del kit <i>Thrombin Screen</i></b>                                                                      | <b>239</b> |
| <b>Anexo 7: Digestión de albúmina de suero bovino con endoproteinasa Arg-C</b>                                                                                  | <b>241</b> |



|                                                                                                                                                                        |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Anexo 8: Gráficas del efecto de diferentes ligandos sobre la estabilidad térmica de la trombina mediante termofluorescencia</b>                                     | <b>243</b> |
| <b>Anexo 9: Características de la obtención del complejo trombina·PAR1<sub>L</sub>(R42Q)</b>                                                                           | <b>245</b> |
| <b>Anexo 10: Listado de complejos de trombina·sustrato que se prepararon para los ensayos de cristalización</b>                                                        | <b>247</b> |
| <b>Anexo 11: Resonancias de los carbonos <math>\alpha</math> y <math>\beta</math> asignados a los residuos del FVIIIa1 utilizando la herramienta <i>StripScope</i></b> | <b>253</b> |
| <b>Anexo 12: Valores de los desplazamientos químicos observados de los residuos asignados del fragmento FVIIIa1 libre</b>                                              | <b>259</b> |
| <b>Anexo 13: Valores de los desplazamientos químicos observados de los residuos asignados del fragmento FVIIIa1 en presencia de trombina</b>                           | <b>263</b> |



## LISTA DE FIGURAS



## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.1</b> Representación esquemática parcial de la cascada de coagulación                                                                             | 8  |
| <b>Figura 1.2</b> Representación esquemática del complejo X-asa unido a su único sustrato fisiológico, el Factor X                                            | 9  |
| <b>Figura 1.3</b> Representación esquemática del papel de la vía de la proteína C en la regulación de la coagulación                                          | 11 |
| <b>Figura 1.4</b> Representación esquemática de la estructura de la protrombina humana y sus posibles vías de activación                                      | 13 |
| <b>Figura 1.5</b> Representación de la estructura 3D de la molécula de trombina                                                                               | 14 |
| <b>Figura 1.6</b> Estructura 3D del factor VIIIa                                                                                                              | 22 |
| <b>Figura 1.7</b> Mecanismo de activación del factor VIII                                                                                                     | 23 |
| <b>Figura 1.8</b> Activación del FVIII <i>wild-type</i> y sus mutantes mediada por la trombina                                                                | 26 |
| <b>Figura 1.9</b> Representación esquemática del receptor de transmembrana PAR1 y su mecanismo de activación                                                  | 31 |
| <b>Figura 1.10</b> Representación de la estructura tridimensional del fragmento PAR1(33-57) unido a la variante inactiva de trombina, Ser195Ala               | 33 |
| <b>Figura 1.11</b> Estructura del complejo trombina·trombomodulina                                                                                            | 35 |
| <b>Figura 1.12</b> Interacción de la trombina con el dominio GPIb $\alpha$                                                                                    | 37 |
| <b>Figura 1.13</b> Estructura de la SC y mecanismo de activación de la protrombina                                                                            | 38 |
| <b>Figura 1.14</b> Inhibición de la trombina por dos miembros de la familia I14 de inhibidores de peptidasas, la hirudina y la hemadina                       | 40 |
| <b>Figura 1.15</b> Estructura tridimensional del complejo trombina·heparina                                                                                   | 43 |
| <b>Figura 1.16</b> Estructura tridimensional del complejo entre el fragmento E (sin los fibrinopéptidos) del fibrinógeno y el exosito I de la trombina humana | 44 |
| <b>Figura 1.17</b> Estructura 3D del complejo entre el FVa2 y el exosito I de la trombina humana                                                              | 45 |

|                                                                                                                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 1.18</b> Representación esquemática del mecanismo de activación propuesto del factor V humano                                                          | 47  |
| <b>Figura 3.1</b> Dispositivos empleados para la concentración de las soluciones de proteínas                                                                    | 56  |
| <b>Figura 3.2</b> Representación esquemática de las interacciones en las que se basa la cromatografía de afinidad por cationes $\text{Ni}^{2+}$                  | 68  |
| <b>Figura 3.3</b> Esquema del montaje en "sandwich" para la transferencia de proteínas a una membrana sintética                                                  | 76  |
| <b>Figura 3.4</b> Modalidades de cristalización por difusión de vapor                                                                                            | 78  |
| <b>Figura 3.5</b> Ilustración esquemática del diagrama de solubilidad de una proteína                                                                            | 80  |
| <b>Figura 3.6</b> Técnica de micro-seeding para el crecimiento de cristales de proteína                                                                          | 81  |
| <b>Figura 3.7</b> Sistema utilizado para congelar, conservar y analizar los cristales                                                                            | 83  |
| <b>Figura 3.8</b> Representación de la señal de un espectro monodimensional de RMN en el que se indican algunas de sus características básicas                   | 90  |
| <b>Figura 4.1</b> Resumen esquemático de los mecanismos de interacción entre el centro activo de la trombina y los ligandos que utilizamos en esta investigación | 95  |
| <b>Figura 4.2</b> Evidencia de la digestión preferencial del lazo 70-80 en la cadena pesada de la trombina libre en presencia de la endoproteinasa Arg-C         | 97  |
| <b>Figura 4.3</b> Incremento de la estabilidad térmica de la trombina en presencia de ligandos específicos del sitio activo y del exosito I                      | 99  |
| <b>Figura 4.4</b> Comparación de las estructuras 3D de trombina libre e inhibida con FPR                                                                         | 102 |
| <b>Figura 4.5</b> Estructura de la trombina inhibida con FPR obtenida a partir de un cristal crecido en la condición de cristalización <i>Pro-Plex 1-20</i>      | 107 |
| <b>Figura 4.6</b> Estructura 3D de la trombina inhibida con FPR obtenida a partir de un cristal crecido en la condición de cristalización <i>Pro-Plex 1-18</i>   | 110 |
| <b>Figura 4.7</b> Estructura 3D de la trombina humana obtenida a partir de un cristal crecido en la condición de cristalización <i>Morpheus 1-25</i>             | 112 |

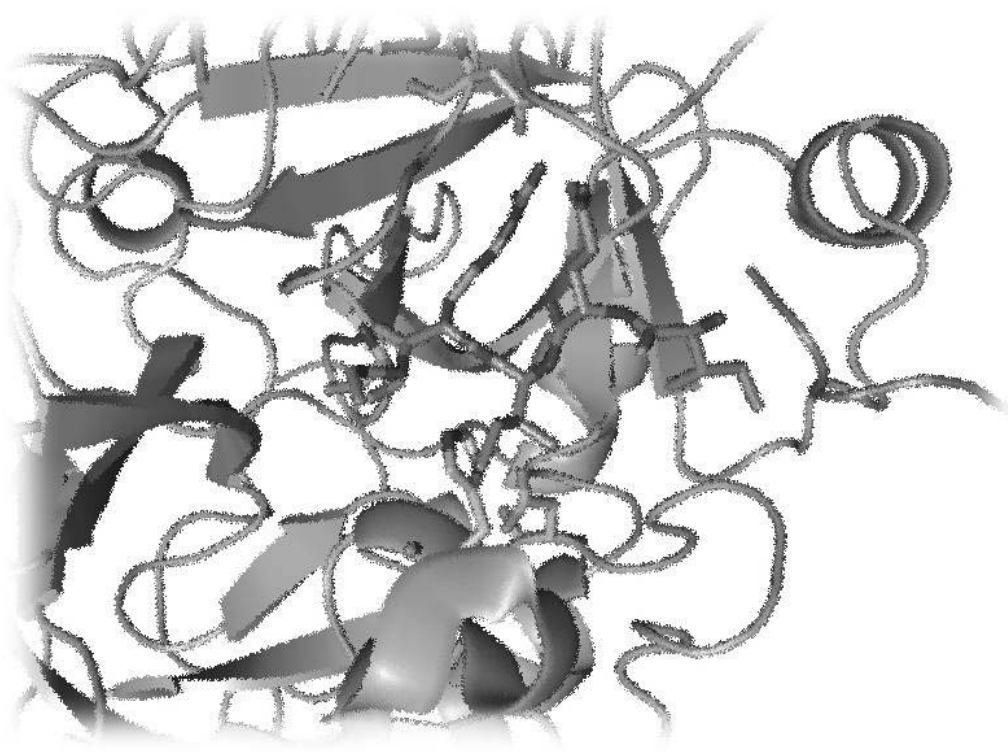
|                                                                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 4.8</b> Estructura 3D de la trombina humana cristalizada en el sistema ortorrómbico, obtenida a partir de un cristal crecido en la condición de cristalización <i>Morpheus 1-25</i> | 114 |
| <b>Figura 4.9</b> Alineamientos múltiples de los conectores interdominios del FVIII de diferentes especies de mamíferos                                                                       | 116 |
| <b>Figura 4.10</b> Análisis por SDS-PAGE de la expresión heteróloga y la purificación del conector FVIIIa1                                                                                    | 117 |
| <b>Figura 4.11</b> Verificación de la identidad del fragmento recombinante FVIIIa1                                                                                                            | 118 |
| <b>Figura 4.12</b> Verificación de la identidad del fragmento FVIIIa1                                                                                                                         | 119 |
| <b>Figura 4.13</b> Preparación del fragmento recombinante FVIIIa1 marcado con nitrógeno-15 para estudios de RMN                                                                               | 120 |
| <b>Figura 4.14</b> Verificación de la identidad del fragmento FVIIIa1- <sup>15</sup> N a emplear en los ensayos de RMN                                                                        | 121 |
| <b>Figura 4.15</b> Análisis de la expresión y purificación en <i>batch</i> de las fracciones correspondientes a la sobreexpresión del conector FVIIIa2                                        | 122 |
| <b>Figura 4.16</b> Sobreexpresión y purificación del fragmento recombinante FVIIIa3                                                                                                           | 123 |
| <b>Figura 4.17</b> Verificación de la identidad del fragmento FVIIIa3                                                                                                                         | 124 |
| <b>Figura 4.18</b> Verificación de la identidad del fragmento recombinante FVIIIa3                                                                                                            | 125 |
| <b>Figura 4.19</b> Alineamientos múltiples del dominio extracelular de PAR1 de diferentes especies de mamíferos                                                                               | 126 |
| <b>Figura 4.20</b> Sobreexpresión y purificación del dominio extracelular del receptor PAR1 <sub>L</sub> humano                                                                               | 127 |
| <b>Figura 4.21</b> Análisis de la expresión y purificación del fragmento del dominio extracelular PAR1 <sub>S</sub>                                                                           | 128 |
| <b>Figura 4.22</b> Demostración de la formación de los complejos trombina·FVIIIa1 y trombina·FVIIIa3 mediante experimentos de <i>band-shift</i>                                               | 130 |
| <b>Figura 4.23</b> Demostración de la formación del complejo trombina·PAR1 mediante experimentos de <i>band-shift</i>                                                                         | 131 |

|                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 4.24</b> Imágenes obtenidas en dos posiciones ortogonales de los espectros de difracción de rayos X de un cristal de trombina·PAR1 <sub>L</sub> (R42Q)                                                                                           | 134 |
| <b>Figura 4.25</b> Estructura del complejo trombina·PAR1 <sub>L</sub> (R42Q)                                                                                                                                                                               | 135 |
| <b>Figura 4.26</b> Vista detallada de la región alrededor del exosítio I de la trombina en el complejo trombina·PAR1 <sub>L</sub> (R42Q)                                                                                                                   | 137 |
| <b>Figura 4.27</b> Espectro preliminar de correlación $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ del fragmento FVIIIa1- $^{15}\text{N}$                                                                                                                                | 139 |
| <b>Figura 4.28</b> Cambios en los espectros de correlación $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ del fragmento FVIIIa1- $^{15}\text{N}$ en presencia de trombina                                                                                                  | 140 |
| <b>Figura 4.29</b> Formación del complejo trombina·FVIIIa1 estudiada por RMN                                                                                                                                                                               | 141 |
| <b>Figura 4.30</b> Superposición de los espectros HSQC $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ del fragmento FVIIIa1- $^{15}\text{N}$ libre y en presencia de 20 $\mu\text{M}$ de trombina                                                                          | 142 |
| <b>Figura 4.31</b> Superposición de los espectros HSQC $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ del fragmento FVIIIa1- $^{15}\text{N}$ libre y en presencia de 20 $\mu\text{M}$ de trombina previamente incubada con un exceso del péptido C-terminal de la hirudina | 143 |
| <b>Figura 4.32</b> Superposición de los espectros HSQC $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ del fragmento FVIIIa1- $^{15}\text{N}$ libre y en presencia de 40 $\mu\text{M}$ de trombina inhibida con FPR (A) y de 20 $\mu\text{M}$ del Factor X (B)              | 143 |
| <b>Figura 4.33</b> Asignación mediante protón amida ( $^1\text{H}$ ) de los residuos del fragmento FVIIIa1 correspondientes a las resonancias en el espectro HSQC $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$                                                           | 145 |
| <b>Figura 4.34</b> Asignación de los residuos del fragmento FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ correspondientes al recuadro indicado en la figura 4.33                                                                                                  | 146 |
| <b>Figura 4.35</b> Asignación mediante protón amida ( $^1\text{H}$ ) de los residuos del fragmento FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ en presencia de trombina a partir de las resonancias en el espectro HSQC $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$           | 147 |
| <b>Figura 4.36</b> Asignación de los residuos del fragmento FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ en presencia de trombina correspondientes al recuadro indicado en la figura 4.35                                                                         | 147 |
| <b>Figura 4.37</b> Superposición de los espectros HSQC $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ del fragmento FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ libre y en presencia de trombina                                                                                 | 148 |

|                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 4.38</b> Espectros de correlación $^{13}\text{CO}$ - $^{15}\text{N}$ (CON) del fragmento FVIIIa1 libre y en presencia de trombina                                                                                                      | 149 |
| <b>Figura 4.39</b> Asignación mediante carbono-13 de los residuos del fragmento FVIIIa1 correspondientes a las resonancias en el espectro de correlación $^{13}\text{CO}$ - $^{15}\text{N}$                                                      | 150 |
| <b>Figura 4.40</b> Asignación de los residuos del fragmento FVIIIa1- $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ correspondientes al recuadro indicado en la figura 4.39                                                                                   | 150 |
| <b>Figura 4.41</b> Asignación mediante carbono-13 de los residuos del fragmento FVIIIa1- $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ en presencia de trombina a partir de las resonancias en el espectro de correlación $^{13}\text{CO}$ - $^{15}\text{N}$ | 151 |
| <b>Figura 4.42</b> Asignación de los residuos del fragmento FVIIIa1- $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ en presencia de trombina correspondientes al recuadro indicado en la figura 4.41                                                          | 152 |
| <b>Figura 4.43</b> Superposición de los espectros CON del fragmento FVIIIa1 libre y en presencia de trombina                                                                                                                                     | 152 |
| <b>Figura 5.1</b> Representación esquemática de los cambios estructurales y en la temperatura de desnaturalización entre la protrombina y la trombina estabilizada por ligandos dirigidos al sitio activo o a los exositos                       | 160 |
| <b>Figura 5.2</b> Modelo de interacción entre residuos del lazo 70-80 del exosito I de la trombina libre con el sitio activo de la endoproteasa Arg-C                                                                                            | 162 |
| <b>Figura 5.3</b> Estructura 3D del ectodominio de PAR1 en interacción con la trombina                                                                                                                                                           | 166 |
| <b>Figura 5.4</b> Similitudes y diferencias entre la estructura del complejo trombina·PAR1 resuelta en este trabajo con la estructura presentada por Gandhi y colaboradores (A) y con el complejo trombina·Hir-C (B)                             | 169 |
| <b>Figura 5.5</b> Ordenamiento de las moléculas del complejo trombina·PAR1 (Thr <sup>37</sup> -Thr <sup>102</sup> ) en el cristal                                                                                                                | 171 |
| <b>Figura 5.6</b> Resumen esquemático de los residuos de FVIIIa1 que interaccionan con la trombina                                                                                                                                               | 176 |
| <b>Figura 5.7</b> Modelaje de la secuencia Ile <sup>369</sup> -Gly <sup>373</sup> correspondiente a los subsitios P <sub>4</sub> -P <sub>1</sub> en su complejo productivo con la trombina                                                       | 176 |
| <b>Figura 5.8</b> Esquema parcial de las secuencias de los cofactores FVa2, FVIIIa1 y FVIIIa2, del dominio extracelular del receptor PAR1 y del péptido C-terminal de la hirudina                                                                | 178 |



|                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 5.9</b> Representación esquemática de las interacciones de la trombina con el FVIIIa1                                                  | 179 |
| <b>Figura 5.10</b> Vista detallada de la estructura 3D alrededor de los residuos Glu <sup>389</sup> -Asp <sup>394</sup> del dominio A2 del FVIII | 181 |
| <b>Figura 5.11</b> Representación de la estructura 3D alrededor de los residuos Glu <sup>717</sup> -Asp <sup>725</sup> del conector a2 del FVIII | 182 |
| <b>Figura 5.12</b> Modelo de los cambios conformacionales propuestos durante la activación del FVIII generados por dinámica molecular            | 184 |
| <b>Figura 5.13</b> Alineamiento de las secuencias de los conectores interdominios a1 y a3 del FVIII humano                                       | 185 |



## LISTA DE TABLAS



## LISTA DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabla 3.1</b> Secuencias y características fisicoquímicas básicas de los fragmentos derivados del factor VIII humano y del receptor PAR1 utilizados en el presente estudio                                                                      | 59  |
| <b>Tabla 3.2</b> Secuencias de nucleótidos clonadas en los plásmidos de expresión para la producción recombinante de los fragmentos de interés descritos en la tabla 3.1                                                                           | 61  |
| <b>Tabla 3.3</b> Relación de cebadores diseñados para la mutagénesis dirigida del FVIIIa1, FVIIIa3 y PAR1 <sub>L</sub>                                                                                                                             | 65  |
| <b>Tabla 3.4</b> Características de las líneas para macromoléculas biológicas de los sincrotrones ESRF (Grenoble) y ALBA (Barcelona) utilizadas para la recogida de los datos de difracción                                                        | 84  |
| <b>Tabla 4.1</b> Valores termodinámicos de la trombina libre y trombina en presencia de ligandos específicos del sitio activo y del exosito I                                                                                                      | 98  |
| <b>Tabla 4.2</b> Desviación estándar de los valores de la temperatura de desnaturalización de las diferentes relaciones molares de trombina y ligandos específicos del sitio activo y del exosito I                                                | 100 |
| <b>Tabla 4.3</b> Temperatura promedio de desnaturalización de la trombina libre y trombina en presencia de ligandos específicos del sitio activo y del exosito I obtenida mediante termofluorescencia diferencial                                  | 100 |
| <b>Tabla 4.4</b> Características de los cristales empleados para resolver las estructuras de trombina libre y trombina inhibida con FPR a resolución casi atómica                                                                                  | 101 |
| <b>Tabla 4.5</b> Parámetros estadísticos de la calidad de los datos de difracción y del refinamiento para la trombina cristalizada en el grupo espacial $P2_12_12_1$                                                                               | 103 |
| <b>Tabla 4.6</b> Parámetros estadísticos de la calidad de los datos de difracción y del refinamiento para la trombina-FPR cristalizada en el grupo espacial C2                                                                                     | 104 |
| <b>Tabla 4.7</b> Características principales de los cristales obtenidos en diferentes condiciones de cristalización en los que se resolvieron estructuras de trombina libre o inhibida con FPR con dimensiones de celda no reportadas previamente. | 106 |
| <b>Tabla 4.8</b> Parámetros estadísticos de la calidad de los datos de difracción y del refinamiento para la trombina-FPR cristalizada en el grupo espacial $P2_1$ a partir de la condición Pro-Plex 1-20.                                         | 108 |

|                                                                                                                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabla 4.9</b> Parámetros estadísticos de la calidad de los datos de difracción y del refinamiento para la trombina-FPR cristalizada en el grupo espacial $P2_1$ a partir de la condición Pro-Plex 1-18. | 109 |
| <b>Tabla 4.10</b> Parámetros estadísticos de la calidad de los datos de difracción y del refinamiento para la trombina cristalizada en el grupo espacial $P2_1$ a partir de la condición Morpheus 1-25     | 111 |
| <b>Tabla 4.11</b> Parámetros estadísticos de la calidad de los datos de difracción y del refinamiento para la trombina cristalizada en el grupo espacial $C222_1$ a partir de la condición Morpheus 1-25   | 115 |
| <b>Tabla 4.12</b> Relación exhaustiva de las combinaciones entre formas de la trombina y sus sustratos utilizadas en los ensayos de cristalización.                                                        | 132 |
| <b>Tabla 4.13</b> Parámetros estadísticos de la calidad de los datos de difracción y del refinamiento para el complejo Trombina-PAR1 <sub>L</sub> R42Q                                                     | 136 |
| <b>Tabla 5.1</b> Incremento en la temperatura de desnaturalización de la trombina en presencia de ligandos                                                                                                 | 157 |
| <b>Tabla 5.2</b> Temperatura de desnaturalización de la trombina (libre o inhibida) y sus formas zimógenas                                                                                                 | 159 |



## 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1 LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) representan la primera causa de mortalidad y morbilidad a nivel mundial, causando alrededor de 1.9 millones de muertes anuales, solamente en la Unión Europea. En España, aproximadamente uno de cada tres decesos es causado directamente por una enfermedad cardiovascular. Esto supone un coste al sistema sanitario nacional de unos 8.000 millones de euros al año, una cantidad que se eleva hasta casi 196.000 millones de euros en la Unión Europea. Respecto al presupuesto total en sanidad, en España el 8.0% se dedica a las enfermedades cardiovasculares, y la inversión supone un 9% del total en la Unión Europea (datos referidos al año 2009)<sup>1</sup>. De estos costos totales, el 54% representa los gastos directos en cuidados sanitarios, el 24% la pérdida de productividad y el 22% restante el cuidado informal de la persona con la ECV. Por tanto, el estudio de las causas de estas enfermedades no sólo posee una gran relevancia clínica, sino también socio-económica.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ECV engloban las enfermedades del corazón y de los vasos sanguíneos: cardiopatía coronaria (i.e. enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardíaco o miocardio), enfermedades cerebrovasculares (i.e. enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro), arteriopatías periféricas (i.e. enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores), cardiopatía reumática (i.e. lesiones del miocardio y de las válvulas cardíacas debidas a la fiebre reumática, una enfermedad causada por estreptococos), cardiopatías congénitas (i.e. malformaciones del corazón presentes desde el nacimiento), y trombosis venosas profundas y embolias pulmonares (asociadas con coágulos de sangre o trombos formados en las venas de las piernas, que pueden desprenderse [émbolos] y alojarse en los vasos del corazón o los pulmones).

El presente trabajo se centra en las bases moleculares de la actividad de la trombina, una proteasa serínica que, como su nombre indica, es esencial para los procesos que conducen a la formación de coágulos sanguíneos, y por tanto extremadamente relevante para la

---

<sup>1</sup> Nichols M, Townsend N, Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Scarborough P, Rayner M. European Cardiovascular Disease Statistics 2012. European Heart Network, Brussels, European Society of Cardiology, Sophia Antipolis.



trombosis. La definición clínica de trombosis es la presencia patológica de un coágulo en un vaso sanguíneo o en el corazón que causa la obstrucción del flujo sanguíneo en el sistema circulatorio. Dependiendo de donde se localice el trombo (es decir, en la parte venosa o arterial del sistema vascular), la enfermedad trombótica puede clasificarse en trombosis venosa o arterial. Ambos tipos de trombosis se consideran enfermedades distintas, y se caracterizan por diferentes mecanismos patogénicos y factores de riesgo subyacentes [Rosendaal, 1999;2005]. Sin embargo, la perturbación del equilibrio hemostático natural es común a la patogénesis de ambas formas de trombosis. Como veremos en el epígrafe siguiente, en individuos sanos la hemostasia está cuidadosamente controlada mediante varios mecanismos anticoagulantes que equilibran las fuerzas procoagulantes, previniendo así la coagulación sanguínea inapropiada y el riesgo de aparición de trombosis. Cuando este equilibrio se altera desplazándose a favor de las fuerzas procoagulantes, el riesgo de formación de trombos aumenta [Rosendaal, 1999].

A mediados del siglo XIX, el pionero en el campo de la hemostasia, Rudolph Virchow, postuló que existen tres causas principales que contribuyen a la formación de un trombo, conocidas como la triada de Virchow: (i) cambios en la composición de la sangre, (ii) en la pared vascular, y (iii) en el flujo sanguíneo [Virchow, 1856]. La trombosis arterial está mediada por cambios en la pared vascular (aterosclerosis), mientras que los factores de riesgo conocidos para la trombosis venosa pueden dividirse en aquellos que son atribuibles a cambios en el flujo sanguíneo (estasis), o a cambios en la composición de la sangre que conducen a su hipercoagulabilidad.

Aunque la amplia clasificación de Virchow es todavía válida, en la actualidad la visión de la trombogénesis es más refinada producto de los progresos realizados en este campo de investigación. Hoy día se acepta que la trombosis es una enfermedad multifactorial que puede ocurrir como consecuencia de la interacción entre dos o más factores de riesgos genéticos o adquiridos (i.e. ambientales o conductuales), cuya sinergia provoca la superación del umbral anticoagulante e inclina así la balanza hemostática natural entre los elementos pro- y anticoagulantes. Los factores de riesgo adquiridos para la trombosis incluyen cambios inducidos por condiciones tales como el embarazo, intervenciones quirúrgicas, la inmovilización, condiciones hipobáricas, enfermedades autoinmunes, la dieta, el tabaquismo y el uso de anticonceptivos orales, además de trastornos intercurrentes como la diabetes mellitus, la dislipidemia, la hipertensión o la hiperhomocisteinemia [Rosendaal, 1999;2005, Seligsohn and Zivelin, 1997].

En cuanto a los condicionantes genéticos involucrados en el desplazamiento del equilibrio hemostático hacia la coagulación, la de mayor frecuencia es aquella que afecta al sistema anticoagulante de la proteína C (PC), patología denominada como resistencia a la proteína C activada (APC). Esta patología no sólo está causada por la mutación factor V<sub>Leiden</sub> u otras formas polimórficas del factor V de coagulación (FV) [Dahlback, Carlsson, *et al.*, 1993, Williamson, Brown, *et al.*, 1998, Chan, Lee, *et al.*, 1998], sino también por las deficiencias en la PC [Zoller and Dahlback, 1994] o en su cofactor, la proteína S (PS) [García de Frutos, Fuentes-Prior, *et al.*, 2007]. Otra causa común de trombosis es la insuficiencia de un importante inhibidor de la trombina y del factor Xa, la antitrombina (AT, originalmente llamada antitrombina III; para las características principales de estos factores pro- y anticoagulantes, ver los siguientes epígrafes) [Lane and Caso, 1989], así como niveles elevados de factores procoagulantes como el factor VIII o la protrombina [Dahlback, 2000, Vencesla, Corral-Rodríguez, *et al.*, 2008]. Además, otros factores diferenciales son la edad, el sexo y el estilo de vida, los cuales afectan a la acumulación de riesgos de trombosis en los individuos.

Las implicaciones (pato)fisiológicas de la formación de trombos, no sólo en el contexto de las enfermedades cardiovasculares, sino también en muchos procesos vinculados con las respuestas inflamatorias -que participan en el desarrollo y evolución de placas de ateroma-, han provocado estudios detallados de las bases moleculares de estos procesos. Un elemento esencial de los mismos son las reacciones bioquímicas que subyacen a la activación de la cascada de la coagulación, y que se detallan en el epígrafe 1.3.

## 1.2 HEMOSTASIA

La hemostasia es el mecanismo fisiológico responsable de controlar la fluidez de la sangre, orquestando la rápida formación de un coágulo sanguíneo ante daños en el sistema vascular, con el propósito de detener las pérdidas de este fluido vital. Las tres fases en las que se dividen convencionalmente los procesos hemostáticos (i.e. hemostasia primaria, coagulación y fibrinólisis) están en realidad estrechamente relacionadas entre sí, y se regulan estrictamente para sellar de manera efectiva las heridas vasculares y promover la reparación vascular.

La formación del trombo primario (hemostasia primaria) se inicia con la adhesión de las plaquetas a las fibras de colágeno que se encuentran bajo el endotelio vascular, y que quedan expuestas al ser dañado un vaso sanguíneo. La unión de las plaquetas está mediada por la

glicoproteína Ia/IIa (un receptor de colágeno específico para estas células<sup>2</sup>), y el factor de von Willebrand (vWF), que forman enlaces entre las plaquetas y las fibras de colágeno [Sakariassen, Bolhuis, *et al.*, 1979]. Como resultado de esta interacción, las plaquetas se activan y liberan una serie de compuestos, incluyendo factores de la cascada de la coagulación como el factor VIII (epígrafe 1.5), así como sustancias que estimulan aún más la activación plaquetaria. A continuación, las plaquetas se adhieren unas a otras mediante receptores de la familia de las integrinas, lo cual resulta en la formación del coágulo de plaquetas hemostático.

Por otra parte, la activación de plaquetas conduce a cambios notables en la distribución de los fosfolípidos de membrana gracias a la activación de varias proteínas de transporte. Entre éstas se encuentra la proteína llamada “escramblasa”, que promueve el transporte de fosfolípidos cargados negativamente desde la capa interna a la externa de la membrana. Este es un evento crítico, ya que estos fosfolípidos proporcionan una plataforma para el reclutamiento de los factores de la coagulación, lo cual es crucial para la propagación eficiente de la cascada (epígrafe 1.3). La iniciación de la coagulación sanguínea (conocida también como hemostasia secundaria) tiene como resultado la formación de trombina, una enzima que convierte, entre otros sustratos, el fibrinógeno soluble en fibrina, cuyos monómeros se agregan de forma espontánea para formar fibras insolubles que dan lugar a un coágulo de fibrina inicial. Una descripción más detallada de esta cascada de reacciones se presenta en el siguiente epígrafe.

La tercera y última fase de la hemostasia es la fibrinólisis, o eliminación de los depósitos de fibrina una vez que las paredes vasculares han sido reparadas. Para este fin, el plasminógeno unido a fibrina es activado por el activador tisular del plasminógeno (tPA). La plasmina generada de esta forma es capaz de degradar proteolíticamente a la fibrina, disolviendo de esta manera la malla del coágulo.

La formación de un coágulo estable gracias a la agregación de plaquetas y la polimerización de la fibrina tras un daño vascular, es un proceso muy rápido e importante que evita pérdidas extensivas de sangre. Sin embargo, este sistema puede derivar en una coagulación excesiva que resultaría en la formación de trombos capaces de obstruir la irrigación

---

<sup>2</sup> Empíricamente, las plaquetas son definidas como masas citoplasmáticas anucleadas con formas esféricas u ovoides cuando se encuentran en reposo. Para simplificar, no obstante, nos referiremos a ellas a lo largo de todo el documento como células.

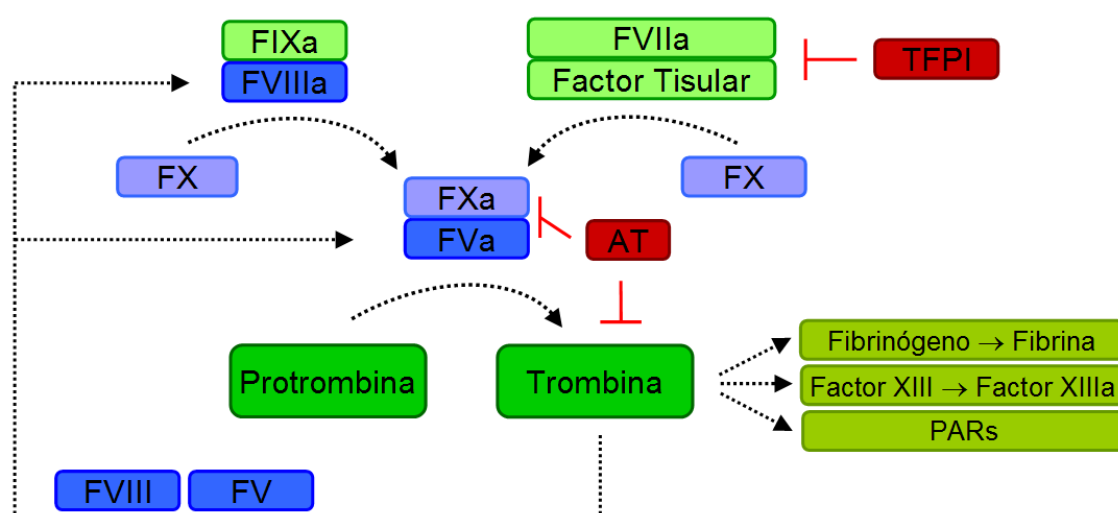
normal de órganos vitales. Para evitarlo, nuestro organismo posee diferentes mecanismos anticoagulantes, capaces de controlar el complejo proceso de formación del trombo a diferentes niveles, y que prevalecen sobre los mecanismos procoagulantes en condiciones normales, manteniendo así el balance hemostático.

Los sistemas de regulación que proporcionan un control efectivo de la actividad procoagulante actúan principalmente sobre los factores de la coagulación, y serán abordados en los epígrafes 1.3 y 1.4 con más detalle. Uno de estos sistemas comprende los inhibidores circulantes que neutralizan la acción de los factores que pertenecen a la familia de las proteasas semejantes a la tripsina. Entre estos inhibidores se encuentran la antitrombina [Lane and Caso, 1989] y el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) [Morrissey, 2001, Baugh, Broze, *et al.*, 1998]. Un segundo mecanismo de regulación negativa de la hemostasia, y el principal sistema de control de la trombosis, es la llamada vía de la proteína C [Dahlback and Villoutreix, 2003, Dahlback, 2004, Dahlback and Villoutreix, 2005, Esmon, 1989] que se inicia con la formación del complejo trombina-trombomodulina [Fuentes-Prior, Iwanaga, *et al.*, 2000]. Las reacciones catalizadas por este complejo desencadenan una serie de mecanismos anticoagulantes y antifibrinolíticos que se describen más detalladamente en el epígrafe siguiente. En condiciones fisiológicas, la presencia de inhibidores circulantes y la vía de la PC actúan de forma conjunta para establecer el umbral de la trombosis mencionado con anterioridad, previniendo fundamentalmente la generación explosiva e incontrolada de la trombina. La importancia fisiológica de estos mecanismos de regulación negativa queda reflejada en la observación que deficiencias de la AT, la PC o la PS (implicada en la vía de la PC) resultan en un mayor riesgo de trombosis venosa [Garcia de Frutos, Fuentes-Prior, *et al.*, 2007, Schwarz, Fischer, *et al.*, 1984, Egeberg, 1965, Griffin, Evatt, *et al.*, 1981].

### 1.3 LA CASCADA DE COAGULACIÓN

La cascada de coagulación es una cadena de reacciones bioquímicas, postulada independientemente por Davie y Ratnoff y por MacFarlane [Davie and Ratnoff, 1964, Macfarlane, 1964], y cuyo resultado final es la formación de un trombo sanguíneo. (Si bien el concepto de “cascada” ha quedado superado con el descubrimiento de numerosos lazos de retroalimentación, y es más apropiado referirse al “sistema de la coagulación”, por razones prácticas en este trabajo continuaremos utilizando el término “cascada”; ver la Figura 1.1 para un esquema simplificado de la misma).

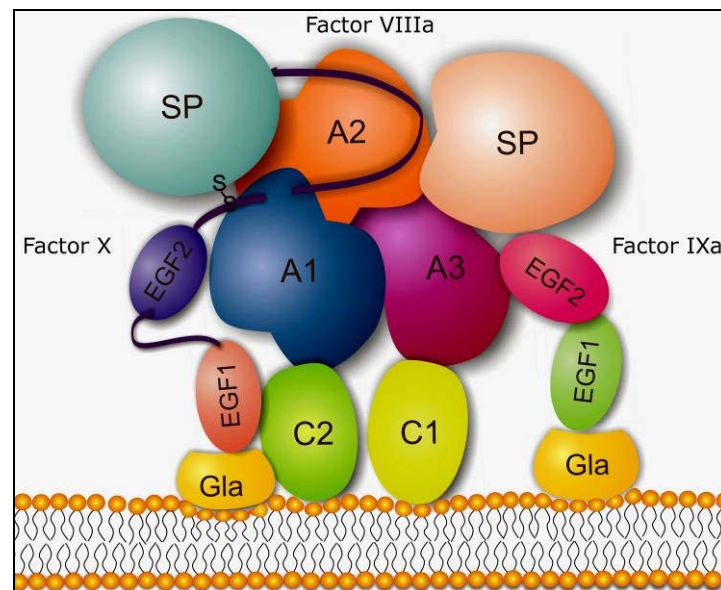
Durante mucho tiempo se han considerado por separado una vía intrínseca de activación de la cascada, iniciada por el factor XII y la calicreína; y una vía extrínseca, iniciada por el factor tisular (TF). Actualmente es aceptado que el complejo de la glicoproteína TF y el factor VII activado (FVIIa) es el que desencadena la formación de un coágulo *in vivo*, como respuesta a un daño vascular. Cuando la pared de un vaso sanguíneo es dañada, el TF, que se encuentra en las capas subendoteliales de la misma, forma un complejo, -en presencia de iones calcio-, con el FVIIa que circula en la sangre a bajas concentraciones [Nemerson and Repke, 1985, Rao and Rapaport, 1988, Sakai, Lund-Hansen, *et al.*, 1989, Hagen, Gray, *et al.*, 1986]. La generación de pequeñas cantidades de FVIIa a partir de su zimógeno, el factor VII, puede ser catalizada por trazas de proteasas circulantes en el plasma (i.e. el factor Xa, el factor IXa, la trombina, o el propio factor VIIa) [Radcliffe and Nemerson, 1975, Masys, Bajaj, *et al.*, 1982, Wildgoose and Kisiel, 1989, Pedersen, Nordfang, *et al.*, 1990], o bien por el activador del FVII (FSAP), una proteasa serínica caracterizada recientemente [Romisch, 2002].



**Figura 1.1 Representación esquemática parcial de la cascada de coagulación.** Para simplificar, sólo se muestran las reacciones principales; y no se incluye la activación del FIX por el complejo TF-FVIIa. Nótese los múltiples papeles procoagulantes de la trombina, la cual convierte al fibrinógeno en monómeros de fibrina que polimerizan espontáneamente, activa al FXIII, y además activa a los factores de coagulación que participan más arriba en la cascada de reacciones (i.e. FV, FVIII), y que impulsan la generación de más trombina; así como a las plaquetas (procesando a los receptores activados por proteasas, PARs). Se incluyen dos inhibidores endógenos esenciales de la cascada de coagulación: (i) el inhibidor multidominio de tipo Kunitz, TFPI, que bloquea al FVIIa unido al TF de manera dependiente de FXa, y (ii) la antitrombina (AT) activada por heparina, que inhibe tanto al FXa como a la trombina. Modificado de [Corral-Rodriguez, Macedo-Ribeiro, *et al.*, 2009].

El complejo FVIIa-TF activa a los zimógenos factor IX y factor X mediante proteólisis limitada [Bauer, Kass, *et al.*, 1990, Di Scipio, Kurachi, *et al.*, 1978, Osterud and Rapaport, 1977, Di Scipio, Hermodson, *et al.*, 1977]. El factor IXa resultante forma entonces un complejo con el factor VIIIa, en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfolípidos, conocido como complejo X-asa o tenasa

(ver Figura 1.2). Este complejo, en el que el FVIIIa actúa como cofactor esencial del FIXa, es el principal activador del factor X. Dicha activación ocurre mediante proteólisis limitada del mismo enlace que es hidrolizado por el complejo FVIIa·TF,  $\text{Arg}^{194}\text{-Ile}^{195}$  (numeración del factor X humano maduro) [Nemerson and Repke, 1985, Mann, 1999, Davie, Fujikawa, *et al.*, 1991, Lenting, van Mourik, *et al.*, 1998]. Se sabe que el FIXa puede activar al FX muy lentamente, pero en presencia del FVIIIa la velocidad de activación del FX se incrementa en unas 200.000 veces [van Dieijen, Tans, *et al.*, 1981].



**Figura 1.2 Representación esquemática del complejo X-asa unido a su único sustrato fisiológico, el Factor X.** La molécula de FVIIIa (en el centro) se une a la membrana fosfolipídica a través de los dominios C1 y C2. El FVIIIa interacciona principalmente a través del dominio A2 (de color naranja) con el factor IXa. Estas interacciones, junto a la unión del factor IXa a la membrana, conducen a la formación de un complejo enzimático estable (el complejo X-asa o tenasa) que convierte al FX en FX activo (FXa). El péptido de activación del FX se indica como un lazo que apunta hacia el centro activo del FIXa. Gla indica un dominio rico en residuos de  $\gamma$ -carboxiglutamato; EGF1/EGF2, dominios similares al factor de crecimiento epidérmico; y SP, proteasa serínica. Modificado de [Vencesla, Corral-Rodriguez, *et al.*, 2008].

Por otra parte, el factor Xa forma un complejo con el factor Va en presencia de iones calcio y fosfolípidos [Tracy, Nesheim, *et al.*, 1981] que se conoce como complejo protrombinasa, y que es el responsable de la conversión de la protrombina en trombina mediante la hidrólisis de los enlaces peptídicos  $\text{Arg}^{271(1I)}\text{-Thr}^{272(1H)}$  y  $\text{Arg}^{320(15)}\text{-Ile}^{321(16)}$  (numeración correspondiente a la proteína madura; los superíndices entre paréntesis indican la numeración por correspondencia topológica con la tripsina y la quimotripsina, que es usada comúnmente para describir los dominios catalíticos de las proteasas serínicas) [Mann, Nesheim, *et al.*, 1990, Bode, Turk, *et al.*, 1990]. El factor Va participa en la activación de la protrombina actuando como cofactor esencial del FXa; su presencia incrementa la velocidad de reacción

unas 100,000 veces [Nesheim, Taswell, *et al.*, 1979]. Por tanto, la activación de los factores V y VIII mediante proteólisis limitada es crítica para una rápida generación de trombina. En las fases iniciales de la formación del coágulo, ambos cofactores son activados por el factor Xa recién formado en presencia de iones calcio, sin embargo, dicha activación ocurre mucho más eficientemente si es mediada por la trombina. Por esta razón, una vez generadas pequeñas cantidades de trombina se establece un lazo de retroalimentación positiva muy importante (ver Figura 1.1) [Monkovic and Tracy, 1990, Nesheim and Mann, 1979, Esmon, 1979, Suzuki, Dahlback, *et al.*, 1982].

Como resultado final de la cascada de reacciones resumida más arriba, se libera al torrente sanguíneo la trombina- $\alpha$  o simplemente trombina<sup>3</sup>, cuya estructura y función se describen en detalle en el epígrafe siguiente. Esta proteasa convierte el fibrinógeno en fibrina mediante proteólisis limitada [Blomback and Blomback, 1972] y activa al factor XIII en presencia de iones calcio. El factor XIIIa es una transglutaminasa que entrelaza monómeros de fibrina, lo que resulta en la formación de un coágulo insoluble [Lorand, 2001].

Otra función esencial de la molécula de trombina es la activación de la agregación plaquetaria a través de los receptores activados por proteasas (PARs) [Coughlin, 2005, Gandhi, Chen, *et al.*, 2011, Ludeman, Kataoka, *et al.*, 2005]. Particularmente, el receptor PAR1 es uno de los sustratos fisiológicos de la trombina que es procesado con mayor especificidad ( $k_{\text{cat}}/K_m = 30 \pm 1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), por lo que actúa como un sensor exquisito de la presencia de trombina [Ayala, Cantwell, *et al.*, 2001]. Además, y como mencionamos más arriba, la trombina estimula potentemente su propia generación a través de la activación de los cofactores que participan en las reacciones previas a su generación (*upstream*) dentro de la cascada de la coagulación (i.e. FV y FVIII).

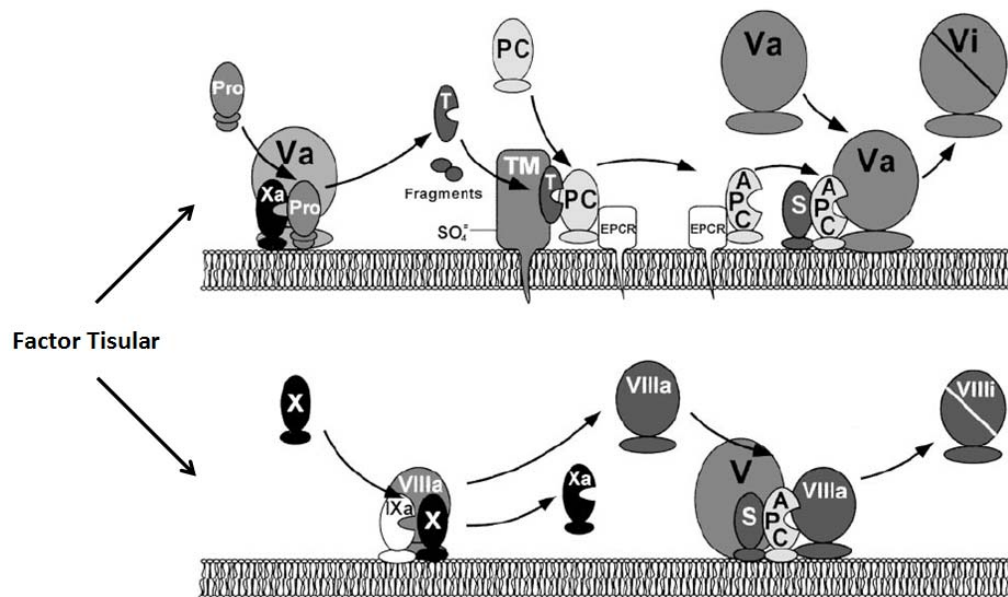
Como hemos mencionado anteriormente, la regulación de esta cascada de reacciones es esencial para el mantenimiento de la hemostasia, destacando la antitrombina (AT) entre las proteínas circulantes que intervienen en la inhibición de la coagulación de manera endógena. La acción de la AT se ve particularmente potenciada en presencia de glicosaminoglicanos

---

<sup>3</sup> La trombina generada fisiológicamente como consecuencia de la cascada de reacciones es conocida como trombina- $\alpha$ , de la cual derivan bien por autólisis o por proteólisis las formas menos activas denominadas trombina- $\beta$  y trombina- $\gamma$ . La trombina- $\beta$  se genera por un corte del enlace Arg<sup>75</sup>-Tyr<sup>76</sup> de la cadena pesada de la trombina- $\alpha$ , y la trombina- $\gamma$  se genera por un corte adicional en la trombina- $\beta$  entre Lys<sup>149E</sup> y Gly<sup>150</sup>. A lo largo de este documento, el término trombina se referirá exclusivamente a la forma trombina- $\alpha$ .

cargados negativamente, de los cuales el más estudiado es el sulfato de heparán. Otros inhibidores plasmáticos incluyen la macroglobulina- $\alpha_2$  y el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI). Estas proteínas plasmáticas forman complejos estables con las proteasas serínicas como la trombina o el factor Xa, bloqueando completamente sus actividades procoagulantes [Lane and Caso, 1989, Baugh, Broze, *et al.*, 1998, Mitchell, Piovella, *et al.*, 1991, Ye and Goldsmith, 2001].

Como se indicó en el epígrafe 1.2, la otra vía de inactivación endógena de los procesos de coagulación es la degradación de los factores Va y VIIIa por la proteína C activada (APC) (Figura 1.3) [Dahlback and Villoutreix, 2005, Esmon, 2000]. La generación de la APC por la trombina requiere de su unión a la trombomodulina (TM), lo cual estimula la reacción de activación unas 20.000 veces [Esmon, 1989, Fuentes-Prior, Iwanaga, *et al.*, 2000, Esmon and Owen, 1981]. Por otra parte, las reacciones de inactivación ocurren también por proteólisis limitada en presencia de iones calcio y fosfolípidos.



**Figura 1.3 Representación esquemática del papel de la vía de la proteína C en la regulación de la coagulación.** La cascada de reacciones iniciada con la exposición del TF conduce a la formación de los complejos tenasa (FVIIIa-IXa) y protrombinasa (FVa-Xa), y en último término a la formación de la trombina. La trombina libre funciona como un potente factor procoagulante al generar fibrina y activar las células endoteliales y las plaquetas. En cambio, una vez unida a la trombomodulina (TM), la trombina activa rápidamente a la proteína C (APC), en un proceso favorecido por el receptor endotelial de la PC, el EPCR. Una vez que la APC se disocia del EPCR, se une a la proteína S, y este complejo inactiva entonces a los factores Va y VIIIa. En el caso del factor VIIIa, este proceso es favorecido por la presencia adicional del factor V. Figura extraída de [Esmon, 2003].

Los inhibidores mencionados anteriormente bloquean directamente la actividad proteolítica de las proteasas serínicas. A diferencia de ellos, la vía de la PC regula la formación de las enzimas procoagulantes factor Xa y trombina, mediante la inactivación proteolítica de los



cofactores de coagulación FVa y FVIIIa que, como hemos mencionado antes, son cofactores esenciales dentro de los complejos protrombinasa y tenasa, respectivamente. La inactivación proteolítica de FVa y FVIIIa (a diferencia de la inactivación espontánea debida a la disociación del dominio A2 del cofactor FVIIIa) es efectuada por la APC y estimulada por otro cofactor no enzimático, la proteína S [He, Shen, *et al.*, 1998, Nyberg, Dahlback, *et al.*, 1998, Evenas, Garcia de Frutos, *et al.*, 2000]. Además, durante la degradación del FVIIIa mediada por la APC, el FV actúa sinérgicamente como un cofactor adicional [Shen and Dahlback, 1994, Lu, Kalafatis, *et al.*, 1996], teniendo así un papel dual como molécula pro- y anticoagulante.

## 1.4 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA TROMBINA

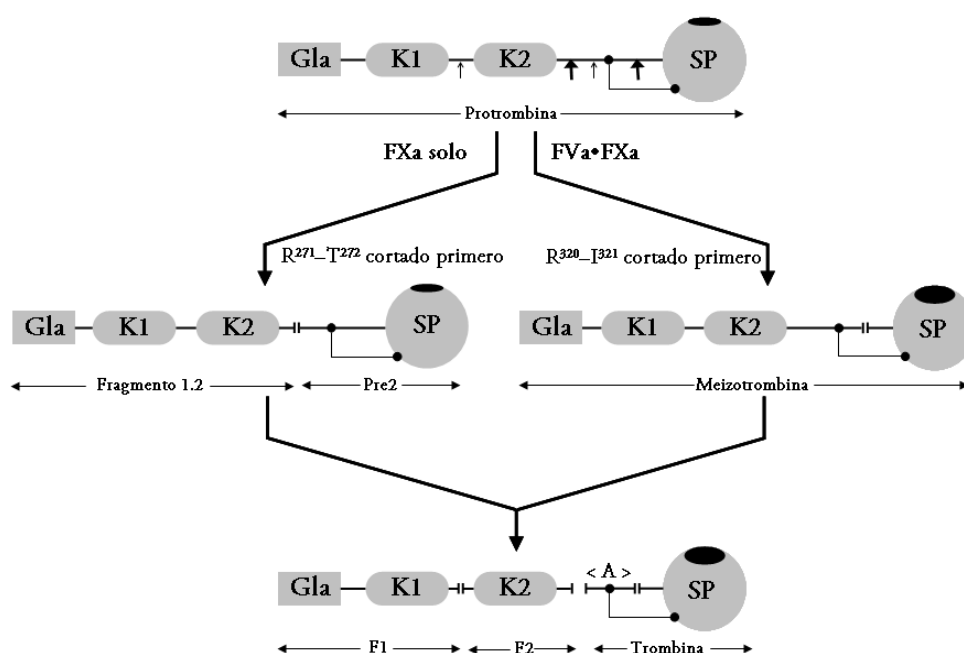
La generación de trombina a partir de la protrombina es un evento central del proceso de coagulación, hasta el punto que la trombina puede ser considerada el factor de la coagulación más importante, teniendo en cuenta la variedad de sustratos esenciales activados por la misma (ver epígrafe 1.4.2). En este capítulo abordamos con más detalle la estructura, función y regulación de esta proteasa serínica.

### 1.4.1 Estructura de la proteinasa

Como se mencionó en el epígrafe 1.3, la trombina se deriva de su forma zimógena inactiva, la protrombina, una glicoproteína de unos 70 kDa que es secretada al torrente sanguíneo tras ser sintetizada en el hígado. La estructura primaria de la protrombina madura comprende un dominio NH<sub>2</sub>-terminal de unos 40 residuos rico en ácidos  $\gamma$ -carboxiglutámicos (Gla) (ver Figura 1.4); la presencia de estos residuos confieren a este pequeño dominio la capacidad de unir iones Ca<sup>2+</sup> y adoptar una conformación adecuada para su unión a las superficies fosfolipídicas aniónicas como las de las plaquetas activadas. Este dominio es seguido de dos módulos de tipo *kringle* de aproximadamente 80 residuos cada uno, y del dominio de proteasa serínica propiamente dicho en el extremo carboxilo. La acción del complejo protrombinasa (FVa·FXa) genera la molécula de trombina de peso molecular 36 kDa aproximadamente (ver Figura 1.4).

La estructura tridimensional (3D) de la trombina- $\alpha$  humana inhibida de manera irreversible con D-Phe-Pro-Arg-clorometilcetona (FPR) fue determinada a finales de los años 80 por Wolfram Bode y colaboradores [Bode, Turk, *et al.*, 1992, Bode, Mayr, *et al.*, 1989]. Este

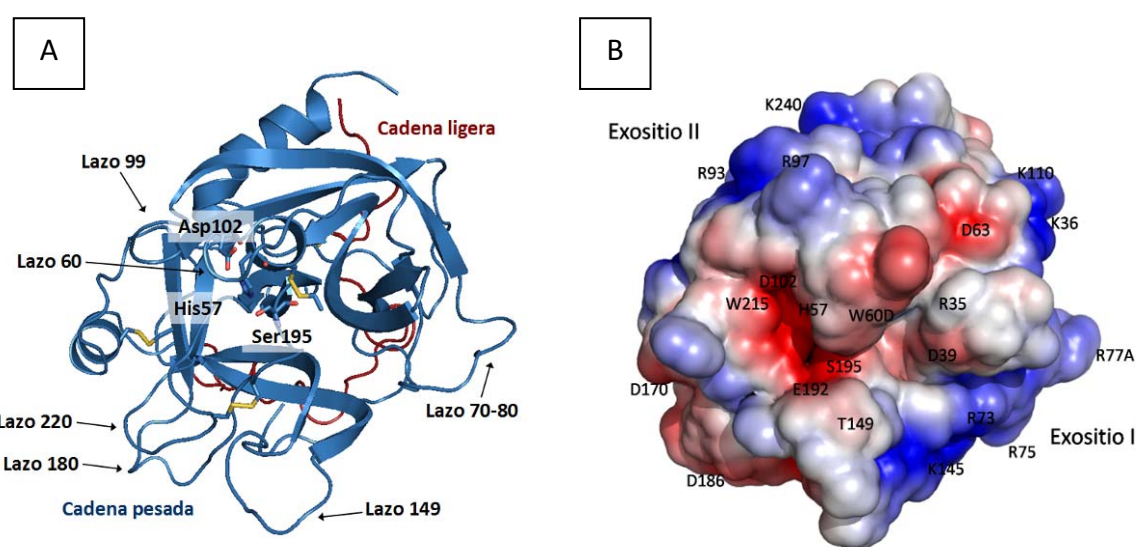
trabajo pionero ha sido seguido de un gran número de investigaciones estructurales, muchas de las cuales están relacionadas con la búsqueda de inhibidores específicos capaces de servir como agentes anticoagulantes. A día de hoy se han depositado más de 300 estructuras de trombina, principalmente humana en el PDB (Base de Datos de Proteínas). Sin embargo, estos trabajos estructurales no han ofrecido una imagen fidedigna del dinamismo conformacional de la trombina que es de gran relevancia para el funcionamiento de esta proteasa serínica [Huntington, 2012, Lechtenberg, Johnson, *et al.*, 2010, Di Cera, Page, *et al.*, 2007].



**Figura 1.4 Representación esquemática de la estructura de la protrombina humana y sus posibles vías de activación.** La protrombina contiene un dominio Gla, seguido de dos dominios de tipo *kringle* (K) y del dominio catalítico propiamente dicho (SP). (La representación esquemática no está a escala, y sólo se representa el puente de disulfuro que conecta la cadena ligera A [*<A>*] con el dominio catalítico). La generación de la trombina a partir de su precursor requiere del corte de dos enlaces peptídicos: uno situado en el conector entre K2 y el dominio catalítico (Arg<sup>271(11)</sup>-Thr<sup>272(1H)</sup>) y el otro en el sitio de activación propiamente dicho (Arg<sup>320(15)</sup>-Ile<sup>321(16)</sup>) (indicados con flechas gruesas en el esquema superior; la numeración corresponde a la proteína madura humana). El factor Xa libre hidroliza preferentemente el enlace Arg<sup>271</sup>-Thr<sup>272</sup>, generando así una forma inactiva llamada pretrombina-2 (Pre2). Por el contrario, la activación del zimógeno por el complejo protrombinasa genera inicialmente una forma intermedia activa, la meizotrombina, al procesarse primero el sitio más C-terminal. Dos cortes adicionales, indicados con flechas más pequeñas, ocurren durante el procesamiento de la protrombina. El enlace Arg<sup>155</sup>-Ser<sup>156</sup> es atacado eficientemente por la trombina, separando así los fragmentos 1 y 2; el corte de este enlace en la protrombina genera el fragmento F1 y la forma inactiva pretrombina-1. (Esta vía, fisiológicamente irrelevante, no ha sido representada para simplificar el esquema). Finalmente, en el zimógeno humano, -pero por ejemplo no en el bovino-, el enlace Arg<sup>284</sup>-Thr<sup>285</sup> es también cortado rápidamente para generar una enzima libre con una cadena A ligeramente más corta.

La molécula de trombina consta de una cadena ligera de 49 residuos unida, mediante un único puente disulfuro, a una cadena pesada de 259 residuos que contiene tres puentes disulfuro intracatenarios (ver Figura 1.5A). La triada de residuos del sitio activo (His<sup>57</sup>, Asp<sup>102</sup>, y

Ser<sup>195</sup>) ocupa el fondo de un surco relativamente estrecho, delimitado por dos grandes lazos insertados en las posiciones 60 y 149, de acuerdo con la numeración basada en la (quimo)tripsina. El análisis de las diferentes estructuras reportadas revela que el lazo 60, el cual es relativamente rígido y restringe el acceso de los sustratos macromoleculares al centro activo, se encuentra bien conservado en las diferentes trombinas de vertebrados (ver tabla resumen de las estructuras reportadas, Anexo 1) [Bode, Turk, *et al.*, 1992]. Por el contrario, el lazo 149, también llamado de autólisis o lazo- $\gamma$ , se encuentra moderadamente conservado entre las diferentes especies, es más hidrofílico, y notablemente más flexible que el anterior. Este lazo también juega un cierto papel en la determinación de la especificidad de la proteasa, participando en el reconocimiento y selección de los sustratos macromoleculares mediante oclusión parcial de la entrada al centro activo. Como resultado de la presencia de estos lazos, y como una diferencia notable con la mayoría de las proteinasas serínicas semejantes a la tripsina, la maquinaria catalítica de la trombina no es fácilmente accesible a los sustratos e inhibidores macromoleculares.



**Figura 1.5 Representación de la estructura 3D de la molécula de trombina.** La proteasa se representa en la orientación estándar en la que el centro activo de la proteasa queda de cara al lector y los sustratos entran al sitio activo de izquierda a derecha [Bode, Mayr, *et al.*, 1989]. **A.** Representación mediante *cartoons*; se indican la cadena ligera (roja) y la pesada (azul), así como los lazos que enmarcan el sitio activo. Nótese que los lazos 60 y 149 restringen el acceso de los sustratos al centro activo. Los residuos del centro activo, His<sup>57</sup>, Asp<sup>102</sup> y Ser<sup>195</sup>, se representan con sus cadenas laterales (*sticks*), y los puentes disulfuro se muestran en amarillo (puentes intracatenarios: Cys<sup>42</sup>-Cys<sup>58</sup>, Cys<sup>159</sup>-Cys<sup>222</sup>, Cys<sup>168</sup>-Cys<sup>182</sup>; puente intercatenario: Cys<sup>1</sup>-Cys<sup>122</sup>). **B.** Representación del potencial electrostático superficial de la molécula de trombina- $\alpha$  humana (el rojo indica potencial negativo y el azul, positivo). Se aprecia una distribución marcadamente asimétrica de las cargas: la región del centro activo tiene un potencial electrostático negativo, mientras que las regiones del exosito I (lazos 37 y 70-80) y del exosito II (principalmente, el lazo 99 y la hélice C-terminal) tienen un marcado potencial positivo. Las imágenes fueron generadas utilizando PyMOL (DeLano Scientific LLC, San Carlos, California, EEUU) y la estructura depositada en el PDB con el código 1PPB.

Una segunda peculiaridad de la molécula de trombina es que, a pesar de tener un punto isoeléctrico neutro, presenta una distribución asimétrica de las cargas en su superficie (Figura 1.5B). Se distingue una región de potencial negativo en el centro activo, que se encuentra entre dos extensas áreas pobladas fundamentalmente por residuos básicos (Lys/Arg). Estas dos regiones, denominadas exositos aniónicos I y II se localizan separadas del aparato catalítico de la proteasa, y le confieren a la trombina una excepcional especificidad por sus sustratos, cofactores e inhibidores [Fuentes-Prior, Iwanaga, *et al.*, 2000, van de Loch, Stubbs, *et al.*, 1996, Fuentes-Prior, Noeske-Jungblut, *et al.*, 1997, Bode, 2006, Huntington, 2005, Pechik, Madrazo, *et al.*, 2004, Corral-Rodriguez, Bock, *et al.*, 2011].

El potencial negativo del centro activo de la trombina se debe principalmente a la presencia de un residuo de ácido glutámico en la posición 192, a diferencia de la glutamina encontrada en la gran mayoría de las proteasas serínicas. La cadena lateral de este glutamato regula el acceso al centro activo de los residuos ácidos de los sustratos, desfavoreciendo en particular la entrada de sustratos que poseen residuos de Asp/Glu en las posiciones  $P_3$ ,  $P_2'$  y/o  $P_3'$  [Marque, Spuntarelli, *et al.*, 2000]. (Cabe aclarar que seguimos la nomenclatura de Schechter y Berger en la que los residuos de los sustratos se denominan  $P_n$ , ...,  $P_1$ ,  $P_1'$ , ...,  $P_m'$ , y el enlace peptídico a hidrolizar une los residuos  $P_1$  y  $P_1'$ . Las regiones de la peptidasa que acomodan a estos residuos se nombran  $S_n$ , ...,  $S_1$ ,  $S_1'$ , ...,  $S_m'$ , respectivamente [Schechter and Berger, 1967]). La cadena lateral del residuo Glu<sup>39</sup>, localizada en la cercanía del centro activo, también contribuye a la especificidad de la trombina y desfavorece la unión de sustratos e inhibidores con cadenas laterales ácidas en las posiciones  $P_2'$  y  $P_3'$  [Le Bonniec, MacGillivray, *et al.*, 1991].

El exosito I está formado esencialmente por los lazos de inserción 37 y 70-80 [Bode, Turk, *et al.*, 1992, Bode, Mayr, *et al.*, 1989] (Figura 1.5). Su importancia para el reconocimiento del fibrinógeno ha sido demostrada mediante la caracterización funcional de mutantes de la trombina [Wu, Sheehan, *et al.*, 1991, Pineda, Cantwell, *et al.*, 2002] y también mediante cristalografía de rayos X [Pechik, Madrazo, *et al.*, 2004]. Al ser uno de los sustratos más importantes de la proteasa, el exosito I se conoce también como exosito de reconocimiento del fibrinógeno. Además, esta superficie es una plataforma esencial para el reconocimiento de otros sustratos como PAR1 [Gandhi, Chen, *et al.*, 2010], FV y FVIII [Corral-Rodriguez, Bock, *et al.*, 2011, Segers, Dahlback, *et al.*, 2007, Esmon and Lollar, 1996, Myles, Yun, *et al.*, 2002];

cofactores como la trombomodulina [Fuentes-Prior, Iwanaga, *et al.*, 2000] e inhibidores endógenos como el cofactor II de la heparina (HCII) [Sheehan, Wu, *et al.*, 1993] ó inhibidores producidos por organismos hematófagos como la hirudina [Stone and Hofsteenge, 1986]. Las interacciones mediadas por el exosito I de la trombina serán abordadas más detalladamente en el epígrafe 1.7.

El exosito II consta primariamente del lazo 99 (residuos del 90-100) y la hélice C-terminal 230-240 (Figura 1.5). Este exosito se conoce también como exosito de unión a heparina, debido a que presenta una alta afinidad por el glicosaminoglicano sulfato de heparán y sus derivados de menor peso molecular, conocidos como heparinas. La heparina funciona como un cofactor para la inhibición de la trombina mediante la AT, y de ahí su uso en la clínica como anticoagulante. Debido a su carácter notablemente más electropositivo que el exosito I, las interacciones que se establecen a través del exosito II son fundamentalmente electrostáticas, a diferencia del carácter más apolar de las interacciones mediadas por el exosito I [Huntington, 2005]. Además de su interacción con glicosaminoglicanos, el exosito II también está implicado en el reconocimiento de los factores V y VIII [Segers, Dahlback, *et al.*, 2007, Myles, Yun, *et al.*, 2002], así como en la unión de la trombina al receptor de plaquetas, la glicoproteína GPIIb/IIIa [Dumas, Kumar, *et al.*, 2003, Celikel, McClintock, *et al.*, 2003]. Aunque no constituye una diana tan importante como el exosito I para la unión de inhibidores, cabe destacar que el exosito II juega un papel esencial en la unión del inhibidor hemadina, aislado de la saliva de la sanguijuela terrestre *Haemadipsa sylvestris* [Richardson, Kroger, *et al.*, 2000].

#### **1.4.2 Sustratos más relevantes**

---

Como ya se ha mencionado, la trombina actúa sobre una serie de sustratos para promover la hemostasia, entre los cuales el más conocido es el fibrinógeno (epígrafe 1.7.4.1). La conversión proteolítica del fibrinógeno a fibrina descubre sitios de polimerización dentro del dominio E central de la molécula de fibrina, lo que permite la asociación no covalente de forma espontánea entre monómeros de fibrina [Pechik, Madrazo, *et al.*, 2004]. La trombina también activa a la transglutaminasa FXIII, la cual cataliza la reacción de entrecruzamiento (*cross-linking*) covalente entre residuos específicos de glutamina y lisina localizados en moléculas adyacentes de fibrina [Chen and Doolittle, 1971]. La estabilidad del coágulo es además incrementada gracias a la acción del complejo trombina-trombomodulina que activa a la pro-carboxipeptidasa conocida como inhibidor de la fibrinólisis activado por la trombina (TAFI) [Bajzar, Manuel, *et al.*,

1995]. La TAFIa elimina los residuos de lisina en el extremo carboxilo de la fibrina que permiten la unión de las enzimas fibrinolíticas y sus zimógenos al coágulo de fibrina, dificultando así su degradación. Además, la trombina amplifica su propia generación mediante dos mecanismos independientes. El primer lazo de retroalimentación positiva es la conversión proteolítica del FXI; donde la trombina genera trazas de FXIa capaces de activar a su vez al FIX [Naito and Fujikawa, 1991]. Por otra parte, y de mayor relevancia fisiológica, la trombina activa a los factores V y VIII (los mecanismos se detallan en el epígrafe 1.5; ver también las referencias [Suzuki, Dahlback, *et al.*, 1982, Myles, Yun, *et al.*, 2002, Fulcher, Roberts, *et al.*, 1983, Kane and Majerus, 1981]).

Finalmente, y complementando su papel en la generación del coágulo de fibrina, la trombina promueve la activación de las plaquetas, lo que conduce no sólo a la agregación de las mismas, sino también a la presentación en su superficie de fosfolípidos procoagulantes como la fosfatidilserina [Majerus and Miletich, 1978, Bevers, Comfurius, *et al.*, 1982]. Las bases moleculares de esta actividad se clarificaron en parte con la identificación de un receptor de trombina activado proteolíticamente en la superficie de las plaquetas, denominado precisamente receptor activado por proteasas, PAR1 (epígrafe 1.6) [Vu, Hung, *et al.*, 1991, Kahn, Zheng, *et al.*, 1998, Xu, Andersen, *et al.*, 1998]. Hasta el momento se han identificado cuatro PARs, los cuales responden a diferentes proteasas, incluyendo no sólo factores de la cascada de coagulación sino también metaloproteasas [Gandhi, Chen, *et al.*, 2011, Ishihara, Connolly, *et al.*, 1997, Nystedt, Emilsson, *et al.*, 1994, Coughlin, 2000]. Además, la trombina promueve la activación plaquetaria a través de su asociación con la glicoproteína de superficie GPIIb/IIIa, que entre otras funciones es capaz de actuar como un cofactor en la activación proteolítica de PAR1 [Coughlin, 2005, Adam, Guillin, *et al.*, 2003].

A pesar de la amplia variedad de sustratos procoagulantes activados por la trombina, no todos los efectos de esta proteasa serínica promueven la coagulación. Al unirse a la trombomodulina (TM), el exosito I queda inaccesible a sustratos como el fibrinógeno, impidiendo la acción procoagulante de la trombina (ver epígrafe 1.7.1.1). En cambio, el centro activo de la proteasa permanece accesible, lo que permite la activación de la proteína C y de TAFI gracias a interacciones específicas entre estos sustratos y el receptor endotelial. La APC generada inactiva proteolíticamente al FVa y al FVIIIa, induciendo la supresión de la cascada de la coagulación [Fuentes-Prior, Iwanaga, *et al.*, 2000, Esmon, 1989].

Además de su papel esencial en la promoción y regulación de la formación del coágulo sanguíneo, la trombina provoca numerosas respuestas en otras células distintas de las plaquetas, muchas de las cuales pueden atribuirse a la activación de los PARs (epígrafe 1.6.4) [Gandhi, Chen, *et al.*, 2011, Coughlin, 2000]. Por ejemplo, la trombina estimula la expresión y secreción de moléculas de adhesión celular y la producción de factores de crecimiento y citoquinas en células endoteliales. Asimismo, promueve la elaboración de citoquinas en las células musculares lisas y estimula la proliferación de estas células y de los fibroblastos [Hattori, Hamilton, *et al.*, 1989, Daniel, Gibbs, *et al.*, 1986, Colotta, Sciacca, *et al.*, 1994].

### **1.4.3 Regulación de la actividad**

---

Debido a la importancia de los procesos en los que participa la trombina, la regulación eficiente de su actividad es esencial para mantener la hemostasia y prevenir la formación inapropiada de coágulos sanguíneos. Como se mencionó anteriormente, ciertos miembros de la superfamilia de inhibidores de las proteasas serínicas conocidas como serpinas (del inglés *SERine Proteinase INhibitors*), familia de inhibidores I4, clan ID, de la clasificación MEROPS [www.merops.sanger.ac.uk]) inhiben la actividad catalítica de la trombina en condiciones fisiológicas, y esta reacción es acelerada en gran medida en presencia de glicosaminoglicanos como los sulfatos de heparán y de dermatán.

Las serpinas más importantes responsables de la inhibición de la trombina son la antitrombina, el cofactor II de la heparina, y la proteasa nexina I (PNI). La antitrombina es una proteína abundante en la sangre (2.3 mM) que inhibe, además de a la trombina, a una amplia variedad de proteasas serínicas implicadas en la coagulación sanguínea, y parece ser el principal inhibidor que limita la formación de coágulos intravasculares. Por el contrario, el HCII es altamente específico para la trombina, y parece regular la actividad de la proteinasa en los tejidos extravasculares después de un daño vascular. Finalmente, la PNI inhibe a la trombina preferentemente cerca de la superficie de distintos tipos de células, en una reacción catalizada por el sulfato de heparán como en el caso de la AT [Lane and Caso, 1989, Gettins, 2002, Rosenberg and Damus, 1973, Li, Johnson, *et al.*, 2004, Tollefsen, Majerus, *et al.*, 1982, Baker, Low, *et al.*, 1980].

Por otra parte, como ya se ha indicado en el epígrafe anterior, la formación de trombina también se regula por el lazo de retroalimentación negativa de la proteína C, que ejerce su

efecto anticoagulante a través de la inactivación proteolítica de los cofactores Va y VIIIa [Esmon, 1989]. A su vez, el complejo trombina-TM que genera la APC es modulado por otra serpina, el inhibidor de la proteína C (PCI).

Existe además una gran variedad de inhibidores exógenos de la trombina producidos por distintos organismos hematófagos. Estos inhibidores son utilizados de manera natural por animales como las sanguijuelas o las garrapatas para frenar la coagulación y facilitar la extracción, almacenamiento y digestión de la sangre de la que se alimentan. Entre otros inhibidores naturales de la trombina caracterizados hasta el momento destacan la hirudina, la hemadina, la rodnina, la ornitorina, la boofilina, la triabina y recientemente la anofelina (epígrafe 1.7.3.1 y 1.7.3.2) [Corral-Rodriguez, Macedo-Ribeiro, *et al.*, 2009, van de Locht, Stubbs, *et al.*, 1996, Fuentes-Prior, Noeske-Jungblut, *et al.*, 1997, Macedo-Ribeiro, Almeida, *et al.*, 2008, Corral-Rodriguez, Macedo-Ribeiro, *et al.*, 2010, Figueiredo, de Sanctis, *et al.*, 2012].

#### **1.4.4 Dinamismo conformacional y plasticidad**

---

Como se ha mencionado en los epígrafes anteriores, la trombina interacciona con múltiples ligandos, incluyendo numerosos sustratos, cofactores e inhibidores no relacionados entre sí. De esta forma la trombina actúa como una proteasa pro- y anticoagulante, lo que la convierte en el regulador principal de la hemostasis. Por estas características, y sus implicaciones médicas, es de gran importancia entender cuáles son las bases moleculares de la especificidad de esta proteasa.

Aunque por mucho tiempo se ha hipotetizado sobre diferentes mecanismos de regulación de la actividad de la trombina, incluyendo la influencia de un ión  $\text{Na}^+$  coordinado entre los lazos 180 y 220 [Di Cera, Page, *et al.*, 2007], sólo durante estos últimos años se ha demostrado que la proteasa, en ausencia de ligandos, presenta un notable grado de flexibilidad en regiones que son importantes para su actividad. Actualmente se favorece un modelo dinámico de la estructura de la trombina, que postula la existencia de múltiples estados termodinámicos en transición entre el zimógeno (la protrombina) y la proteasa activa [Huntington, 2012, Lechtenberg, Freund, *et al.*, 2012]. Este modelo establece que la trombina es conformacionalmente dinámica y poco activa, pero que la unión de diferentes ligandos hace que disminuya su flexibilidad e incremente notablemente su actividad [Lechtenberg, Freund, *et al.*, 2012]. Diferentes estudios apoyan este nuevo enfoque, donde la unión del ligando a los



exositos, la coordinación del  $\text{Na}^+$ , y el acceso al sitio activo, se asocian con cambios en la conformación y actividad de la trombina [Lechtenberg, Johnson, *et al.*, 2010, Petrera, Stafford, *et al.*, 2009, Kamath, Huntington, *et al.*, 2010, Koeppe and Komives, 2006, Silva Vde, Cargnelutti, *et al.*, 2011]. Sin embargo, la identificación de las regiones involucradas en estos cambios y sus consecuencias funcionales todavía están por resolverse satisfactoriamente.

Con el objetivo de identificar estas regiones y comprender mejor el alcance de los cambios conformacionales, se han realizado varios estudios biofísicos de la trombina, incluyendo ensayos de intercambio de hidrógeno/deuterio mediante RMN [Koeppe and Komives, 2006, Croy, Koeppe, *et al.*, 2004], espectroscopía de RMN [Lechtenberg, Johnson, *et al.*, 2010], calorimetría isotermal de titulación (ITC) [Kamath, Huntington, *et al.*, 2010] y dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS: *small-angle X-ray scattering*) [Silva Vde, Cargnelutti, *et al.*, 2011]. En este trabajo de investigación se analizará la estabilidad y plasticidad de esta proteinasa serínica libre y en presencia de diferentes ligandos, la metodología y los resultados se presentan en los apartados correspondientes.

## 1.5 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS FACTORES V Y VIII

Para profundizar en el mecanismo de activación del FVIII mediado por la trombina, y para simplificar -debido a la alta homología entre los factores V y VIII y a su relevancia fisiológica-, ambos cofactores serán presentados simultáneamente en este epígrafe.

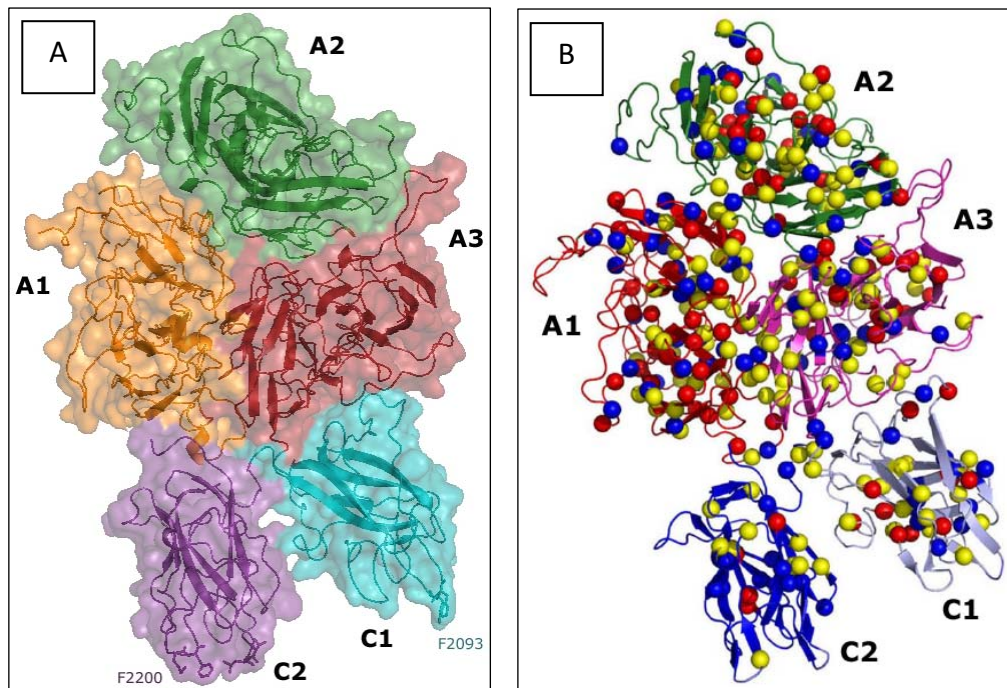
### 1.5.1 Estructura de los factores V y VIII

Tanto el FV como el FVIII son glicoproteínas que presentan una organización de dominios común A1-A2-A3-B-C1-C2 [Jenny, Pittman, *et al.*, 1987, Vehar, Keyt, *et al.*, 1984]. Los tres dominios A de ambos cofactores comparten un ~40% de homología de secuencia entre sí y con la ceruloplasmina, una proteína transportadora de cobre [Takahashi, Ortel, *et al.*, 1984, Church, Jernigan, *et al.*, 1984]. (Las secuencias de aminoácidos de ambos cofactores se comparan en el Anexo 3). Los dominios C de ambos cofactores también comparten más de un 40% de residuos conservados y pertenecen a la extensa familia de dominios semejantes a la discoidina [Church, Jernigan, *et al.*, 1984, Gitschier, Wood, *et al.*, 1984, Kane and Davie, 1988, Koschinsky, Funk, *et al.*, 1986]. Los dominios C1 y C2 permiten el anclaje de los cofactores a membranas fosfolipídicas ricas en fosfatidilserina, mediante interacciones que, a diferencia de

los dominios Gla, son independientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Finalmente, los dominios B de ambos cofactores no guardan ninguna relación a nivel de secuencia aminoacídica, y son excluidos de las formas activadas. Se ha propuesto que el dominio B del FVIII mantiene en estado latente al procofactor, inhibiendo su interacción con el factor IXa tanto por impedimentos estéricos, como por repulsión electroestática. Tras la activación, la liberación de este dominio B conduce a la exposición de las regiones de la molécula de FVIII que son importantes para su interacción con el FIXa, formándose así el complejo tenasa [Myles, Yun, *et al.*, 2002, Ngo, Huang, *et al.*, 2008, Shen, Spiegel, *et al.*, 2008].

De acuerdo a lo expuesto, es evidente la extrema importancia para la comprensión de las funciones pro- y anticoagulantes, disponer de la información estructural de los factores V y VIII activados y los complejos que forman con las proteasas serínicas Xa y IXa, respectivamente. Es así como primeramente se obtuvieron, mediante difracción de rayos X, las estructuras tridimensionales de los dominios C2 de ambos cofactores [Macedo-Ribeiro, Bode, *et al.*, 1999, Pratt, Shen, *et al.*, 1999, Fuentes-Prior, Fujikawa, *et al.*, 2002]. Posteriormente, la estructura del FVa bovino inactivado por la APC (FVa<sub>i</sub>, que carece del dominio A2) fue resuelta a resolución media (2.8 Å) [Adams, Hockin, *et al.*, 2004]. Finalmente, dos estructuras a baja resolución (3.70 Å y 3.98 Å) del FVIIIa han sido presentadas más recientemente [Ngo, Huang, *et al.*, 2008, Shen, Spiegel, *et al.*, 2008]. En concordancia a su similitud con la ceruloplasmina, estos estudios estructurales han revelado una disposición triangular de los tres dominios A, situándose sobre el tándem C1-C2 tanto en el FVa como en el FVIIIa (Figura 1.6) [Church, Jernigan, *et al.*, 1984, Ngo, Huang, *et al.*, 2008, Zaitseva I., 1996].

Por otra parte, la resolución de las estructuras de las proteasas serínicas IXa y Xa, por Bode y colaboradores [Hopfner, Lang, *et al.*, 1999, Brandstetter, Bauer, *et al.*, 1995], ha permitido modelar los complejos tenasa (VIIIa·IXa) y protrombinasa (Va·Xa) [Vencesla, Corral-Rodriguez, *et al.*, 2008, Ngo, Huang, *et al.*, 2008, Autin, Steen, *et al.*, 2006], aunque sólo la determinación experimental de estas estructuras permitirá profundizar en las bases moleculares de la modulación de los factores IXa y Xa por sus cofactores.

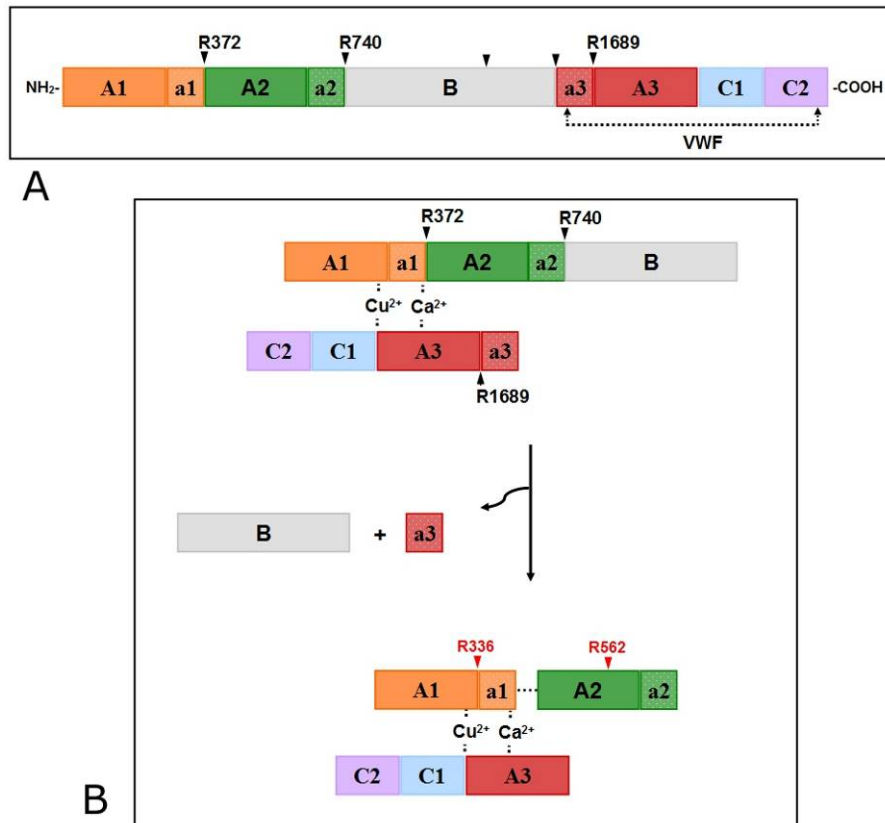


**Figura 1.6 Estructura 3D del factor VIIIa.** **A.** Los dominios individuales del FVIIIa se representan mediante su estructura secundaria (*cartoons*) coloreados naranja (A1), verde (A2), rojo (A3), celeste (C1) y morado (C2). En el fondo, transparente, se representan las superficies de Van der Waals con los mismos colores. Los dominios C1 y C2 permiten el anclaje a membranas fosfolípicas. Se muestran con *sticks* algunos de los residuos que participan en dicha interacción. La figura presentada se generó a partir de la estructura depositada bajo el código 3CDZ del PDB. **B.** La resolución de la estructura del FVIII ha permitido comprender mejor el efecto de las mutaciones identificadas en individuos que padecen de hemofilia A. En la figura se localizan las mutaciones *missense* asociadas a esta patología; nótese que las mutaciones se distribuyen en todos los dominios del FVIIIa. El fenotipo clínico se simboliza mediante esferas de color (amarillas: fenotipo leve, azules: moderado, y rojas: severo, según la base de datos de mutaciones asociadas a hemofilia A (HAMSTeRS, <http://hadb.org.uk/>) [Tuddenham, Schwaab, *et al.*, 1994]. Figura B tomada y modificada de [Shen, Spiegel, *et al.*, 2008].

### 1.5.2 Mecanismo de activación

Otra característica común de los cofactores V y VIII es que, como ya se ha reseñado, la actividad de ambos está regulada por proteólisis limitada catalizada por la trombina y, en menor medida, por el factor Xa [Suzuki, Dahlback, *et al.*, 1982, Fulcher, Roberts, *et al.*, 1983, Kane and Majerus, 1981, Nogami, Wakabayashi, *et al.*, 2003]. En el caso del FVIII, antes de ser secretado al torrente sanguíneo es sometido a proteólisis intracelular en el extremo C-terminal del dominio B, principalmente en las Arg<sup>1313</sup> y Arg<sup>1648</sup> (Figura 1.7). El FVIII resultante forma un heterodímero compuesto por (i) una cadena pesada que incluye la región N-terminal A1-a1-A2-a2 y fragmentos de longitud variada del dominio B; y (ii) una cadena ligera, constituida por los dominios a3-A3-C1-C2. Ambas cadenas contactan a lo largo de una extensa superficie y son estabilizadas con la participación de iones Cu<sup>+2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> [Lenting, van Mourik, *et al.*, 1998, Shen, Spiegel, *et al.*, 2008]. Una vez secretado al torrente sanguíneo, el heterodímero del FVIII se une a su proteína transportadora, el factor de von Willebrand (vWF), y circula en plasma como

proteína inactiva. Esto evita la rápida eliminación del FVIII, y previene además la unión prematura del cofactor a su ligando, el FIXa [Lillicrap, 2008, Lollar, Hill-Eubanks, *et al.*, 1988].



**Figura 1.7 Mecanismo de activación del factor VIII.** Los factores V y VIII son activados por proteólisis limitada efectuada principalmente por la trombina (ó en su ausencia, por el factor Xa), en presencia de fosfolípidos. **A.** Estructura del FVIII inactivo con los dominios globulares A1, A2, A3, B, C1 y C2, así como los conectores interdominios a1 (A1-A2), a2 (A2-b) y a3 (B-A3). Estos conectores son regiones ricas en residuos ácidos que preceden a los sitios de corte y activación de la trombina. Dos flechas en el dominio B indican los sitios de corte reconocidos por las endoproteasas intracelulares que dan origen el heterodímero del FVIII. Se muestra también la zona de interacción con su proteína transportadora, el factor de von Willebrand (vWF). **B.** La trombina hidroliza los enlaces Arg<sup>372</sup>-Ser<sup>373</sup>, Arg<sup>740</sup>-Ser<sup>741</sup> y Arg<sup>1689</sup>-Ser<sup>1690</sup> en el heterodímero del FVIII (R372, R740 y R1689, respectivamente, indicados con flechas). Como consecuencia de estas reacciones se libera el dominio B y el conector a3 de la molécula precursora, dando origen al heterotrímero activo, el FVIIIa, compuesto ahora por los dominios A1, A2, y una cadena formada por los módulos A3, C1 y C2. Este heterodímero se asocia por interacciones electroestáticas (interlineado) y se estabiliza por iones Cu<sup>+2</sup> y Ca<sup>2+</sup>. Las flechas rojas indican los sitios de corte de la APC, que conducen a la disociación del dominio A2 y con ello a la pérdida de la función activadora del cofactor. En el caso del FV, la distribución de dominios es similar, pero carece del conector ácido a1 y el sitio de corte correspondiente, por lo que los dominios A1 y A2 permanecen unidos covalentemente en el FVa.

Al inicio de la cascada de la coagulación, cuando todavía la concentración de trombina es muy baja, el FVIII es activado por el FXa unido a membranas fosfolípicas en presencia de iones calcio. Sin embargo, la mayor cantidad de FVIII se activa posteriormente por la trombina mediante el corte proteolítico de los enlaces entre los residuos Arg<sup>372</sup>-Ser<sup>373</sup>, Arg<sup>740</sup>-Ser<sup>741</sup> y Arg<sup>1689</sup>-Ser<sup>1690</sup>, lo que resulta en la liberación del dominio B y la región ácida a3; y la consecuente formación del heterotrímero activo (Figura 1.7B) [Eaton, Rodríguez, *et al.*, 1986].

El corte inicial después de la Arg<sup>740</sup> aumenta la velocidad de proteólisis de los enlaces Arg<sup>372</sup>-Ser<sup>373</sup> y Arg<sup>1689</sup>-Ser<sup>1690</sup> por la trombina, siendo estos dos últimos cortes importantes para que el cofactor alcance su actividad máxima [Newell and Fay, 2007]. La hidrólisis del enlace Arg<sup>372</sup>-Ser<sup>373</sup> expone un sitio de unión al FIXa [Ngo, Huang, *et al.*, 2008, Bajaj, Schmidt, *et al.*, 2001]; mientras que el procesamiento del sitio más C-terminal favorece la disociación del vWF [Lollar, Hill-Eubanks, *et al.*, 1988]. Además de los activadores endógenos (i.e. el FXa y la trombina) se ha descrito una enzima procedente del veneno de la víbora *Bothrops jararacussu*, BJV-VIIIcp, capaz de activar de forma muy eficiente al FVIII mediante un único corte del enlace Arg<sup>372</sup>-Ser<sup>373</sup> [Hill-Eubanks, Parker, *et al.*, 1989]. Esta observación confirma que la proteólisis en este sitio es imprescindible para la expresión de la máxima actividad del FVIIIa [Lenting, van Mourik, *et al.*, 1998].

La molécula resultante del FVIII activo (FVIIIa) está formada por los dominios A1, A2, y por el extremo C-terminal del procofactor (dominios A3-C1-C2, residuos 1690-2332). Estas tres cadenas están asociadas de manera no covalente mediante interacciones electroestáticas y estabilizadas por iones cobre y calcio [Ngo, Huang, *et al.*, 2008, Tagliavacca, Moon, *et al.*, 1997, Wakabayashi, Koszelak, *et al.*, 2001, Venkateswarlu, 2010] (ver Figura 1.7B). Particularmente, el dominio A2 permanece unido por interacciones electrostáticas débiles al heterodímero A1-A3-C1-C2, y se disocia espontáneamente. Esta labilidad del FVIIIa representa la base de mecanismos de inactivación independientes la APC [Eaton, Rodriguez, *et al.*, 1986, Lollar, Parker, *et al.*, 1992].

El factor V, al igual que el FVIII es activado inicialmente por el FXa, pero también en este caso es la trombina el activador más potente mediante cortes proteolíticos entre los residuos Arg<sup>709</sup>-Ser<sup>710</sup> (entre los dominios A2 y B), Arg<sup>1018</sup>-Thr<sup>1019</sup> (dentro del dominio B) y Arg<sup>1545</sup>-Ser<sup>1546</sup> (en el extremo NH<sub>2</sub>-terminal del dominio A3). El cofactor activado es topológicamente equivalente al FVIIIa, pero al carecer de sitio de corte entre los dominios A1 y A2, el FVa es una molécula dimerica formada por una cadena pesada (dominios A1-A2, unidos covalentemente) y una cadena ligera (dominios A3-C1-C2) [Suzuki, Dahlback, *et al.*, 1982].

### 1.5.3 Función procoagulante de los factores Va y VIIIa

La actividad procoagulante del FVIIIa se debe principalmente a su papel como cofactor del factor IXa dentro del complejo tenasa. La unión del FVIIIa a la membrana fosfolipídica de las

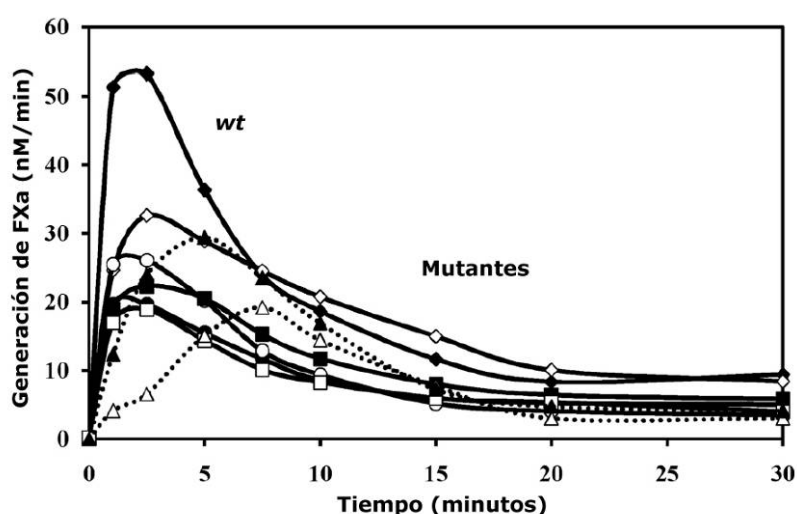
plaquetas y células vasculares a través de los dominios C1 y C2 es fundamental para el desarrollo de su acción [Gale, Pellequer, *et al.*, 2000]. El FIXa por sí solo, activa muy lentamente al FX, pero la velocidad de activación se incrementa en 6 órdenes de magnitud al unirse al FVIIIa [van Dieijen, Tans, *et al.*, 1981, Yuan, Walke, *et al.*, 2005, Saenko, Ananyeva, *et al.*, 2002]. Se ha propuesto que el papel principal del FVIIIa dentro del complejo tenasa es la presentación de exositos tanto para el FIXa unido, como para el FX, los cuales son críticos para el reconocimiento de su sustrato, el FX y su posterior activación [Nogami, Lapan, *et al.*, 2004, Nogami, Freas, *et al.*, 2004].

Se ha demostrado además, que las cadenas del cofactor FVIIIa son necesarias para la interacción con el FIXa dentro del complejo tenasa, con particular relevancia los conectores a1 y a2. Aparentemente, tras el corte del residuo Arg<sup>372</sup> se expone un lazo de unión al FIXa (residuos Try<sup>555</sup>-Asp<sup>569</sup>), mientras que tras el corte del residuo Arg<sup>740</sup> se exponen residuos de tirosinas sulfatadas en el extremo C-terminal del dominio A2 del FVIIIa [Ngo, Huang, *et al.*, 2008, Bajaj, Schmidt, *et al.*, 2001, Venkateswarlu, 2010, Griffiths, Rydkin, *et al.*, 2013, Fay, Mastri, *et al.*, 2001, Fay, Beattie, *et al.*, 1994]. Finalmente, se ha propuesto la región Glu<sup>1811</sup>-Lys<sup>1818</sup> como un sitio de unión adicional del FIXa [Lenting, van de Loo, *et al.*, 1996].

Por otra parte, Fay y colaboradores han reportado que el conector a1 del FVIII (residuos 337-372) presenta afinidad tanto por el zimógeno FX, como por su forma activa FXa; y lo hace interaccionando a través del exosito de unión a heparina de esta proteasa. El elemento central de esta región de interacción parece ser el triplete de residuos de ácido aspártico en las posiciones 361-363. En particular, se determinó que el FXa presenta una afinidad 20 veces mayor por el conector a1 que el zimógeno [Nogami, Lapan, *et al.*, 2004, Lapan and Fay, 1997, Nogami, Wakabayashi, *et al.*, 2003]. Recientemente, se ha reportado que los residuos Thr<sup>2012</sup> y Phe<sup>2014</sup> del dominio A3 del FVIIIa forman parte de un sitio de afinidad para el FX [Takeyama, Wakabayashi, *et al.*, 2012].

Existe evidencia bioquímica y estructural que revela que la activación de los factores V y VIII se realiza mediante interacciones entre los conectores interdominios ácidos y los exositos I y II de la trombina [Corral-Rodriguez, Bock, *et al.*, 2011, Esmon and Lollar, 1996, Myles, Yun, *et al.*, 2002, Bukys, Orban, *et al.*, 2006, Fay, 2004]. En particular, un estudio de mutagénesis dirigida de los residuos 717-725 (D<sup>717</sup>YYEDSYED<sup>725</sup>) dentro del conector a2 del FVIII, ha demostrado que los residuos Glu<sup>720</sup>, Asp<sup>721</sup>, Glu<sup>724</sup> y Asp<sup>725</sup> cargados negativamente,

constituyen una importante región de interacción entre el FVIII y uno de los exositos de la trombina para la activación del cofactor [Newell and Fay, 2008]. Así, mutaciones en estos residuos ácidos disminuyen entre ~10 y ~30 veces la velocidad de proteólisis por la trombina sobre los sitios de corte Arg<sup>372</sup> y Arg<sup>1689</sup>, con la consiguiente reducción en la activación del FVIII (Figura 1.8). Por otra parte, se ha propuesto que la región ácida 389-394 dentro del dominio globular A2 del FVIII, y en particular los aspartatos en las posiciones 392 y 394, interacciona con la trombina a través del exosito II (*heparin binding exosite*), y facilita el corte en la Arg<sup>740</sup> [Nogami, Zhou, *et al.*, 2005].



**Figura 1.8 Activación del FVIII *wild-type* y sus mutantes mediada por la trombina.** El FVIII recombinante *wild-type* y sus mutantes fueron incubados con trombina por el tiempo indicado. Posteriormente la trombina fue inactivada con hirudina y el FVIII activo se incubó con FIXa en presencia de vesículas fosfolipídicas, para formar el complejo tenasa, cuya capacidad para generar FXa es finalmente medida. Nótese la mayor velocidad (nM/min) de generación del FXa en presencia del FVIII *wild-type* comparado con las formas mutantes. Las líneas continuas representan mutantes simples, mientras que las punteadas corresponden a mutantes dobles. Simbología: (♦), FVIII *wild-type*; (◊), Asp717Ala; (●), Glu720Ala; (o), Asp721Ala; (■), Glu724Ala; (·), Asp725Ala; (◐), Glu720Ala/Asp721Ala; (Δ), Glu724Ala/Asp725Ala. Figura extraída de [Newell and Fay, 2008].

En resumen, la evidencia experimental acumulada sugiere que las regiones ricas en residuos ácidos del FVIII juegan un papel preponderante en las interacciones con las áreas de carga neta positiva que representan los exositos de las proteasas FIX, FX y trombina.

Las secuencias de los conectores del FVIII (a1, residuos 337-372; a2, 711-740; y a3, 1649-1689) que preceden a los sitios de corte y activación por la trombina, son ricas en residuos de ácido glutámico, ácido aspártico y tirosina. Es por tanto fácilmente concebible que su interacción con los exositos de la trombina permite orientar los sitios de corte y activación correspondientes (ver Figura 1.7) hacia el sitio activo de la proteasa (ver Figura 1.5). Estas consideraciones, unidas a los resultados experimentales mencionados más arriba, y en

particular los obtenidos recientemente por nuestro grupo con los conectores a2 y a3 del FV [Corral-Rodriguez, Bock, *et al.*, 2011], sugirieron llevar a cabo estudios estructurales de la interacción entre la trombina y los conectores ácidos del FVIII como parte de la presente tesis doctoral, tal y como se detallará más adelante en los capítulos de Materiales y Métodos, y Resultados.

## **1.5.4 Enfermedades asociadas con deficiencias en los factores VIII y V**

---

### **1.5.4.1 Hemofilia A**

La hemofilia A es un trastorno hemorrágico recesivo ligado al cromosoma X, causado por la deficiencia o las alteraciones del factor de coagulación VIII. Debido al papel fundamental de este cofactor en la activación del factor X, su ausencia provoca desórdenes que pueden llegar a ser severos, y cuyas manifestaciones clínicas incluyen hemartrosis, un sangrado intraarticular que afecta especialmente a las articulaciones de la rodilla, el codo o el tobillo, hemorragias que afectan a las articulaciones, el cerebro, el ojo y otros órganos, y hematomas en el tejido suave y muscular. También se presentan hemorragias en las mucosas como la epistaxis (sangrado nasal) y las gingivorragias (sangrado en las encías); estas no revisten mucha gravedad pero requieren tratamiento. La hemofilia A se clasifica en severa, moderada o suave de acuerdo con los niveles de actividad del FVIII detectados en la sangre de los pacientes; las diversas formas se presentan con frecuencias aproximadas del 60, 15 y 25%, respectivamente [Tuddenham, Schwaab, *et al.*, 1994, Hoyer, 1987]. La hemofilia A representa un 80% de todos los casos de hemofilia, mientras que la hemofilia B o enfermedad de Christmas, que se origina por deficiencia del FIX, constituye entre un 10 y un 20% del total de hemofilias. Por último, la hemofilia C o enfermedad de Rosenthal se debe a un déficit del FXI y es poco frecuente, afectando entre el 1-2 % del total de los casos. Finalmente, cabe que mencionar que un bajo porcentaje de individuos desarrollan hemofilia A adquirida; estos pacientes presentan enfermedades autoinmunes y desarrollan anticuerpos contra el FVIII endógeno [Bitting, Bent, *et al.*, 2009].

El tratamiento para los pacientes que presentan deficiencias del FVIII es el suministro de concentrados del cofactor altamente purificado de origen plasmático (natural) o recombinante. La mayor complicación en estos pacientes es el desarrollo de una respuesta inmune a dicho factor, lo cual ocurre entre un 10 y un 40% de los hemofílicos tratados [Ehrenforth, Kreuz, *et al.*,



1992]. En estos casos los pacientes deben recurrir a tratamientos de plasmaféresis o inmunoadsorción para eliminar los anticuerpos generados, y a tratamientos para la administración de inmunosupresores.

La clonación del gen *F8* (Cr. Xq28) en 1984 que codifica para el factor VIII [Toole, Knopf, *et al.*, 1984, Poustka, Dietrich, *et al.*, 1991], permitió un gran avance en la determinación de las bases moleculares y genéticas de esta patología. Indiscutiblemente, el conocimiento de la estructura del FVIII resulta esencial para interpretar el impacto de mutaciones puntuales (mutaciones *missense* y deleciones pequeñas) identificadas en el gen *F8* [Gitschier, Wood, *et al.*, 1984]. Por otra parte, la presencia de ciertas mutaciones permite inferir los papeles funcionales que desempeñan regiones, e incluso residuos específicos del cofactor en las interacciones con otras proteínas como el FIXa o el factor X [Vencesla, Corral-Rodriguez, *et al.*, 2008, Gale, Pellequer, *et al.*, 2000, Jenkins, Freas, *et al.*, 2002]. Es de destacar que se han reportado mutaciones que afectan los sitios de corte por la trombina (por ejemplo, la mutación p.Arg1689Cys se asocia a una hemofilia A severa [Gitschier, Kogan, *et al.*, 1988]).

#### **1.5.4.2 Enfermedad de von Willebrand**

La enfermedad de von Willebrand es una diátesis hemorrágica congénita causada por una anomalía cualitativa y/o cuantitativa del vWF. El déficit cualitativo o cuantitativo del vWF reduce la agregación de plaquetas y la protección del FVIII en sangre frente a su degradación proteolítica [Sadler, Budde, *et al.*, 2006, Pietu, Ribba, *et al.*, 1992, Lavergne, De Paillette, *et al.*, 1992, Hilbert, Gaucher, *et al.*, 1998]. Debido a la variedad de la patología molecular, la enfermedad de von Willebrand se clasifica en 6 subtipos, de los cuales los subtipos 1 y 3 son defectos cuantitativos del vWF, mientras que hay 4 formas diferentes del subtipo II (variantes cualitativas) [Sadler, Budde, *et al.*, 2006].

#### **1.5.4.3 Parahemofilia o enfermedad de Owren**

La deficiencia de FV es muy poco común, y ocurre por herencia homocigótica o por una combinación de alelos deficientes. Sin embargo, las personas que sufren de deficiencia de FV son capaces de sobrevivir [Tracy, Giles, *et al.*, 1984, Hayward, Cramer, *et al.*, 1997, Montefusco, Duga, *et al.*, 2000]. De acuerdo a la teoría clásica de la activación de los factores dentro de la cascada de coagulación, en ausencia del FV y con todos los inhibidores de la reacción presentes, no podría generarse la trombina- $\alpha$ . Sin embargo, los pacientes con esta patología no presentan

un sangrado patológico, o bien éste es manejable. Dicha observación sugiere la existencia de mecanismos compensatorios que permiten prescindir, o al menos de reducir, la necesidad del FV para la generación de los niveles de trombina- $\alpha$  necesarios para la supervivencia.

#### **1.5.4.4 Resistencia a la APC congénita y variante FV<sub>LEIDEN</sub>**

En 1993, Dahlbäck y colaboradores observaron que el plasma de algunos individuos con trombosis venosa presentaba una respuesta reducida a la APC [Dahlback, Carlsson, *et al.*, 1993]. Estos pacientes requerían de concentraciones más altas de APC para alcanzar el mismo tiempo de coagulación que individuos sanos. A esta condición se le denominó resistencia a la APC, y derivó en la identificación posterior de una variante natural del FV, conocida hoy en día como factor V<sub>Leiden</sub> [Bertina, Koeleman, *et al.*, 1994]. El defecto molecular subyacente es la mutación p.Arg506Gln en la molécula del FV humano. El enlace Arg<sup>506</sup>-Gly<sup>507</sup> es el sitio de corte inicial de la APC en la cadena pesada del FVa humano; la hidrólisis de este enlace debilita la interacción con el factor Xa y facilita el corte de inactivación tras la Arg<sup>306</sup> [Tran and Dahlback, 2009]. Debido a que las proteasas serínicas semejantes a la tripsina tienen una marcada preferencia por residuos básicos (Arg/Lys) en la posición P1 de sus sustratos, las moléculas de factor V<sub>Leiden</sub> son inactivadas con una velocidad marcadamente reducida en comparación con el FVa normal (entre un 5 y un 10% la velocidad de inactivación del FVa *wild type*) [Kalafatis, Bertina, *et al.*, 1995, Nicolaes, Tans, *et al.*, 1995, Kalafatis, Haley, *et al.*, 1996, Rosing, Hoekema, *et al.*, 1995]. Por tanto, el factor V<sub>Leiden</sub> se asocia con un fenotipo trombofílico que se manifiesta *in vivo* con un elevado riesgo de trombosis venosa tanto en individuos homocigóticos (80 veces más alto que en individuos con el FV no mutado), como heterocigóticos (aumenta siete veces el riesgo de trombosis) [Zoller and Dahlback, 1994, Koster, Rosendaal, *et al.*, 1993, Greengard, Sun, *et al.*, 1994, Sun, Evatt, *et al.*, 1994, Voorberg, Roelse, *et al.*, 1994].

Adicionalmente, se ha demostrado que los coágulos sanguíneos en individuos homocigóticos para el FV<sub>Leiden</sub> se degradan más lentamente [Bajzar, Kalafatis, *et al.*, 1996]. Esto sugiere que la resistencia del factor V<sub>Leiden</sub> a la inactivación por la APC no sólo conduce a la formación sostenida de trombina, sino que también resulta en un aumento de la activación de la pro-carboxipeptidasa TAFI (epígrafe 1.4.2), y por lo tanto en una eliminación deficiente del coágulo. De esta forma, la activación continuada de la protrombina por el complejo FVa<sub>Leiden</sub>-FXa aumenta la resistencia del coágulo sanguíneo a la lisis [Bajzar, Kalafatis, *et al.*,

1996, Broze and Higuchi, 1996], provocando un defecto hemostático más moderado en individuos con hemofilia A (epígrafe 1.5.4.1).

## 1.6 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR PROTEASAS (PARs)

Como se mencionó en epígrafes anteriores (1.3 y 1.4), otra de las funciones esenciales de la trombina es la activación de la agregación plaquetaria a través de un subgrupo de receptores acoplados a la proteína G, denominados PARs. Aunque PAR1 es uno de los sustratos fisiológicos que es procesado por la trombina con mayor especificidad, el mecanismo molecular de esta activación no está del todo dilucidado. No obstante, para una mejor comprensión del presente trabajo, se describirá brevemente la estructura y función de estos receptores.

### 1.6.1 Estructura de los receptores PARs

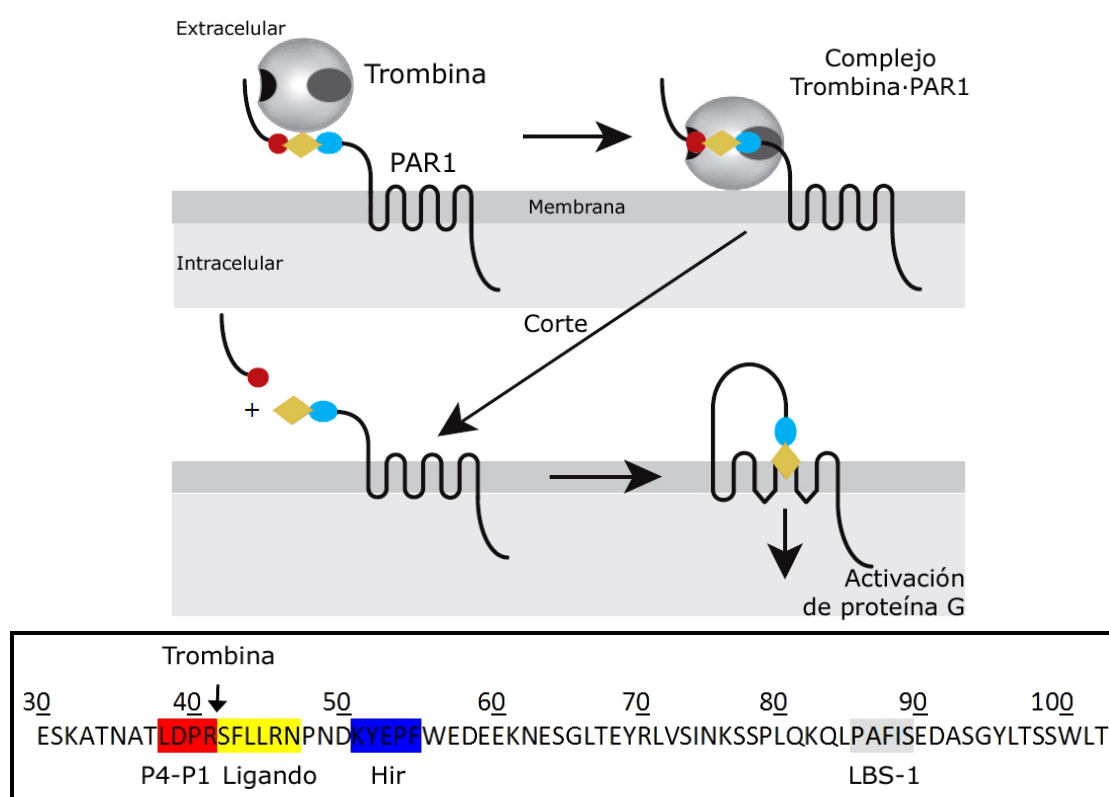
Los PARs son una subfamilia de receptores de transmembrana acoplados a proteínas de unión a GTP (proteínas G; GPCR) expresados fundamentalmente en plaquetas y en el epitelio vascular, pero también en menor grado en células del músculo liso, del sistema inmune y en neuronas. Las respuestas celulares de la activación de estos receptores pueden evidenciarse en procesos patofisiológicos tan diversos como la hemostasia, la coagulación, la inflamación, la embriogénesis y el cáncer [Gandhi, Chen, *et al.*, 2011, Vu, Hung, *et al.*, 1991]. Cada uno de los cuatro PARs identificados hasta el momento responde a un grupo específico de proteasas: PAR1 y PAR3 son receptores activados por trombina, PAR2 presenta afinidad por tripsina, FVIIa y FXa, pero no por trombina, y PAR4 es activado por trombina y tripsina [Xu, Andersen, *et al.*, 1998, Ishihara, Connolly, *et al.*, 1997, Coughlin, 2000].

Estos receptores de transmembrana están compuestos por un dominio extracelular N-terminal seguido de siete hélices de transmembrana conectadas por lazos relativamente cortos. Los sitios de corte y activación se sitúan en el extremo N-terminal del dominio extracelular; en el caso del PAR1 su secuencia (LDPR<sup>42</sup>/S) es muy similar al sitio de corte y activación en el zimógeno de la proteína C (LDPR/I) [Vu, Hung, *et al.*, 1991, Ishii, Gerszten, *et al.*, 1995]. Si bien se ha propuesto a PAR4 como un receptor que participa en la activación de las plaquetas a concentraciones elevadas de trombina [Kahn, Zheng, *et al.*, 1998, Xu, Andersen, *et al.*, 1998], PAR1 es considerado el receptor protrombótico por excelencia debido a su alta especificidad

por la trombina (hasta 90 veces más elevada que PAR3 y PAR4) [Coughlin, 2005, Ayala, Cantwell, *et al.*, 2001].

### 1.6.2 Mecanismo de activación del receptor PAR1

Una vez la trombina hidroliza el enlace peptídico Arg<sup>41</sup>-Ser<sup>42</sup> en PAR1, se expone un nuevo extremo N-terminal que es el ligando específico del propio receptor (Figura 1.9). De esta forma, PAR1 -y el resto de los miembros de la subfamilia- son receptores que portan sus propios ligandos, y permanecen en un estado latente hasta su activación por proteólisis limitada [Coughlin, 2005, Gandhi, Chen, *et al.*, 2011, Myles, Le Bonniec, *et al.*, 2001].



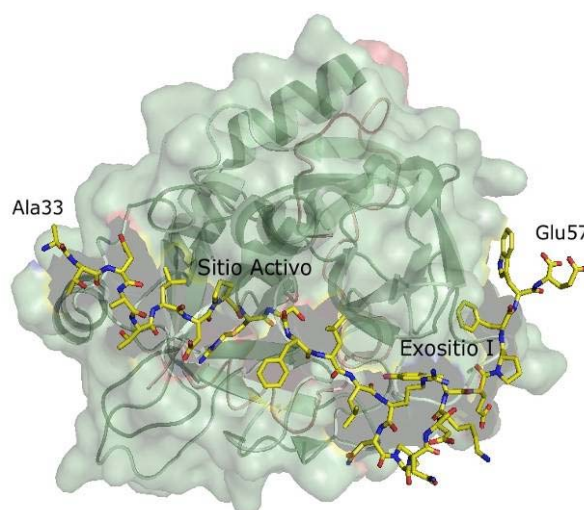
**Figura 1.9 Representación esquemática del receptor de transmembrana PAR1 y su mecanismo de activación.** La trombina interacciona básicamente con dos secuencias dentro del dominio extracelular del receptor: los residuos Leu<sup>38</sup>-Arg<sup>41</sup>, que ocupan los subsitios S<sub>4</sub>-S<sub>1</sub> del centro activo de la proteasa (representados por una esfera roja), y la secuencia similar a la hirudina Lys<sup>51</sup>-Phe<sup>55</sup> (Hir; esfera azul celeste), que interacciona con el exosito I. La trombina activa a PAR1 tras el corte entre los residuos Arg<sup>41</sup> y Ser<sup>42</sup> exponiendo la nueva región N-terminal Ser<sup>42</sup>-Asn<sup>47</sup> (rombo amarillo), que actúa como ligando "interno" al insertarse entre los lazos extracelulares del receptor. En el recuadro se muestra la mayor parte de la secuencia del dominio extracelular de PAR1, resaltando los elementos funcionales en los mismos colores que los usados en la representación esquemática del receptor. Se resalta en gris la secuencia de unión de ligando (LBS-1, residuos P<sup>85</sup>AFIS<sup>89</sup>). Figura modificada de [Coughlin, 2005].

Poco después de la clonación del PAR1 fueron reportados los primeros estudios cristalográficos de la interacción entre la trombina y pequeños fragmentos del dominio extracelular del receptor (residuos Lys<sup>51</sup>-Phe<sup>55</sup>) [Mathews, Padmanabhan, *et al.*, 1994]. Sin

embargo, en las condiciones de cristalización utilizadas los péptidos de PAR1 adoptaron estructuras de láminas  $\beta$  antiparalelas encajadas entre las moléculas de trombina, de significado biológico poco claro. Posteriormente, la resolución de una estructura en solución de una variante soluble del dominio extracelular de PAR1 (Ala<sup>28</sup>-homoSer<sup>103</sup>) permitió determinar que las cadenas laterales de la secuencia similar a la cola C-terminal de la hirudina y los residuos ácidos cercanos a esta se proyectaban hacia el solvente [Seeley, Covic, *et al.*, 2003]. Esta estructura evidenció la existencia de un contacto intramolecular entre la región N-terminal que ejerce como ligando del receptor (residuos Ser<sup>42</sup>-Asp<sup>50</sup>) y una secuencia más C-terminal, llamada sitio de unión del ligando (designado como LBS-1 o *ligand binding site-1*; residuos P<sup>85</sup>AFIS<sup>89</sup>) (ver Figura 1.9).

Finalmente, y durante el desarrollo de este proyecto de tesis doctoral, la estructura cristalina del complejo formado entre una variante inactiva de trombina (Ser195Ala) y un fragmento soluble del dominio extracelular de PAR1, Ala<sup>33</sup>-Glu<sup>57</sup>, fue resuelto a una resolución de 1.8 Å (Figura 1.10) [Gandhi, Chen, *et al.*, 2010]. Esta estructura permitió resolver un fragmento de 25 residuos de largo en la que, como era de esperar, los residuos <sup>38</sup>LDPR<sup>41</sup> del receptor ocupan las posiciones S<sub>4</sub>-S<sub>1</sub> del sitio activo de la proteasa, mientras que los residuos Lys<sup>51</sup>-Trp<sup>56</sup> interaccionan con el exosito I. De este modo, este trabajo presenta la primera estructura de un complejo trombina-sustrato en la que se evidencian simultáneamente interacciones con ambas regiones de la proteasa. Sin embargo, cabe mencionar que la región correspondiente al ligando “interno”, S<sup>42</sup>FLLRN<sup>48</sup>, está en su mayor parte desordenada en esta estructura.

Ciertas contradicciones aparentes entre los trabajos anteriormente citados, así como razonamientos generales acerca del mecanismo de activación de los PARs nos impulsaron a realizar estudios adicionales del receptor PAR1 como parte de la presente tesis doctoral. Con este objetivo, se decidió sobreexpresar variantes del ectodominio de PAR1 correspondientes a la forma inactiva (PAR1<sub>L</sub>, residuos 37-104) y activada del receptor (PAR1<sub>S</sub>, 42-104) para llevar a cabo estudios estructurales de su interacción con la trombina. Los resultados de estos estudios se detallarán en los epígrafes correspondientes.



**Figura 1.10 Representación de la estructura tridimensional del fragmento PAR1(33-57) unido a la variante inactiva de trombina, Ser195Ala.** El mapa de densidad electrónica permitió definir las regiones de PAR1 que interaccionan con el centro activo ( $L^{38}DPR^{41}$ ) y con el exosito I de la trombina (residuos  $K^{51}YEPFW^{56}$ ), entre las cuales se sitúa una región desordenada que fue modelada por Di Cera y colaboradores (PDB 3LU9; [Gandhi, Chen, *et al.*, 2010]).

### 1.6.3 Función procoagulante de PAR1

Como ya hemos mencionado, el receptor PAR1 es capaz de convertir un corte proteolítico extracelular en una señal de transducción con una respuesta celular compleja. En ausencia de estructuras 3D de algún miembro de la subfamilia de los PARs, el mecanismo exacto de unión del nuevo extremo N-terminal a los lazos extracelulares del receptor aun no se conoce. Sin embargo, está bien establecido que los cambios conformacionales inducidos en el receptor por esta interacción intramolecular activan a proteínas heterotriméricas de unión a GTP de las familias G12/13, Gq o Gi/z. Esto genera respuestas tan variadas como cambios en la morfología y agregación de las plaquetas, incremento de la permeabilidad y migración de las células endoteliales, o crecimiento y diferenciación celular, entre otros [Coughlin, 2005]. Una vez generada la señal de respuesta, y similar a otros receptores acoplados a proteínas G, el receptor PAR1 es internalizado a la célula para su reciclamiento o degradación.

### 1.6.4 Respuesta inflamatoria mediada por PAR1

Como se menciona en el epígrafe 1.3, daños en el tejido vascular, ya sea por trauma, infección o inflamación, pueden favorecer la generación de proteasas pro-coagulantes o de otras familias. Estas proteasas pueden activar a los receptores PAR en los distintos tipos de células en que se expresan, incluyendo plaquetas, epitelio vascular, músculo liso, sistema inmune y sistema neuronal. Como es de esperar, la respuesta a la activación de un PAR

específico depende del tipo de célula donde se exprese, entre otros factores. Por ejemplo, la activación de PAR1 en las células endoteliales provoca la liberación de vWF y la presentación de P-selectinas, lo que promueve el movimiento y la adhesión de plaquetas y leucocitos. Por el contrario, en células del músculo liso el PAR1 activado desencadena la producción de quimoquinas y prostaglandinas, mientras que en células nerviosas aferentes favorece procesos de inflamación neurogénica [Hattori, Hamilton, *et al.*, 1989, Daniel, Gibbs, *et al.*, 1986, Colotta, Sciacca, *et al.*, 1994, Esmon, 2004]. Estos ejemplos ilustran que la activación de PAR1 en y alrededor de la pared vascular puede ayudar al reclutamiento de plaquetas y leucocitos, promoviendo así la extravasación para la reparación del daño vascular [de Garavilla, Vergnolle, *et al.*, 2001].

En otro orden de cosas, en células endoteliales PAR1 puede ser activado por la APC en presencia del receptor EPCR y generar respuestas anti-inflamatorias y anti-apoptóticas [Dahlback and Villoutreix, 2005, Riewald, Petrovan, *et al.*, 2002, Flynn and Buret, 2004, Guo, Liu, *et al.*, 2004]. Sin embargo, dado que el corte de activación de PAR1 por la trombina es varios órdenes de magnitud más eficiente que la reacción catalizada por la APC, la relevancia (pato)fisiológica de la activación de PAR1 por la APC es discutible [Ludeman, Kataoka, *et al.*, 2005].

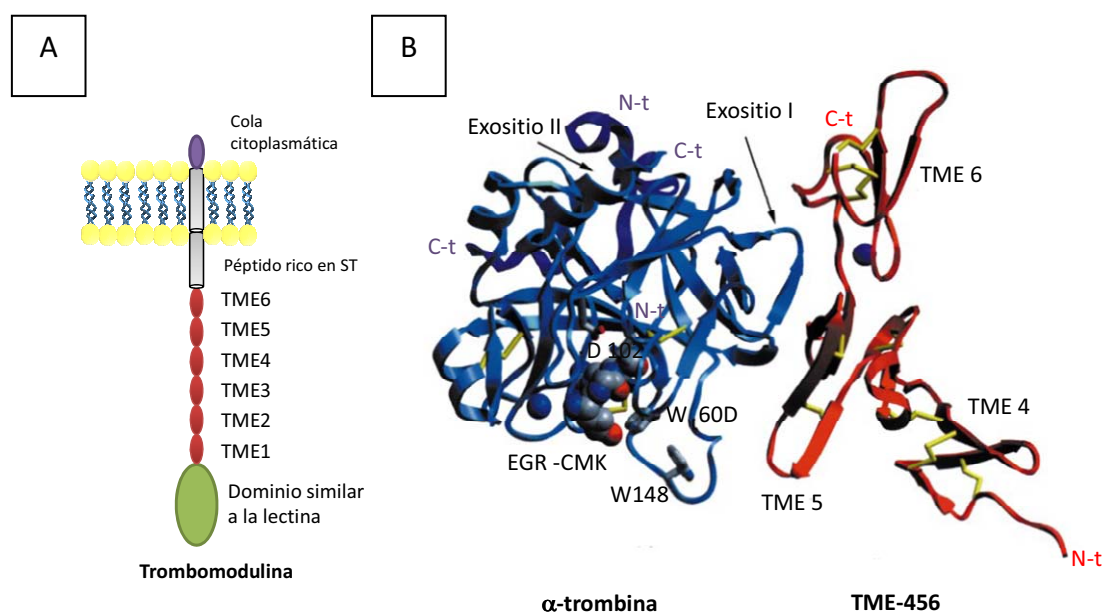
## 1.7 INTERACCIONES MEDIADAS POR LOS EXOSITIOS DE LA TROMBINA

Como se mencionó en el epígrafe 1.4, el reconocimiento de muchos, si no todos, los sustratos fisiológicamente relevantes de la trombina dependen de sus interacciones con uno o ambos exositos de la proteasa. Existe actualmente una importante base experimental que demuestra la importancia crítica de estos residuos para la interacción de la trombina no sólo con sus sustratos macromoleculares, sino también con cofactores e inhibidores proteicos. A continuación resumimos brevemente las características más importantes de aquellas proteínas capaces de interaccionar con los exositos de la trombina, y sobre las cuales existe información estructural.

## 1.7.1 Interacciones con receptores

### 1.7.1.1 El receptor endotelial, la trombomodulina

La trombomodulina (TM) es una proteína transmembrana presente en el endotelio intacto, primordialmente en aquel de los vasos pequeños, y que actúa como receptor de la trombina convirtiéndola en una proteasa anticoagulante gracias a que le confiere la capacidad de activar eficazmente a la PC, y antifibrinolítica por su procesamiento de la pro-carboxipeptidasa TAFI (ver epígrafes 1.3 y 1.4). La estructura cristalina de la trombina humana unida al fragmento más pequeño de la TM capaz de garantizar la activación de la PC, TME456, es conocida [Fuentes-Prior, Iwanaga, *et al.*, 2000] (Figura 1.11). El trabajo estructural demostró que la TM se une al exosítio I de la trombina a través de los dos dominios de tipo EGF más C-terminales (EGF 5 y 6, también denominados TME5 y TME6), cuya superficie posee un potencial electrostático muy negativo.



**Figura 1.11 Estructura del complejo trombina-trombomodulina.** **A.** Representación esquemática de la organización de los dominios de la trombomodulina. El receptor consiste de un dominio N-terminal semejante a las lectinas de tipo C seguido de seis dominios similares al EGF (TME1-6), un péptido rico en serinas/treoninas que presenta varios sitios de O-glicosidación, una hélice transmembrana, y una cola citoplasmática corta. **B.** Representación del complejo entre la trombina-α (azul) y el fragmento TME456 de la trombomodulina (rojo). El inhibidor covalente L-Glu-Gly-L-Arg clorometilcetona (EGR-CMK) mimetiza a los residuos P3-P1 del péptido de activación de la proteína C, y se muestra como esferas con código de color (carbono, gris; nitrógeno, azul; oxígeno, rojo). En amarillo se muestran los enlaces disulfuro. También se muestran las cadenas laterales de los residuos del centro activo His<sup>57</sup> y Asp<sup>102</sup>, así como residuos prominentes de los lazos 60 (Trp<sup>60D</sup>) y 149 (Trp<sup>148</sup>). Note que el receptor endotelial une a la trombina a través de sus dominios TME5 y TME6. Figura modificada de [Fuentes-Prior, Iwanaga, *et al.*, 2000].



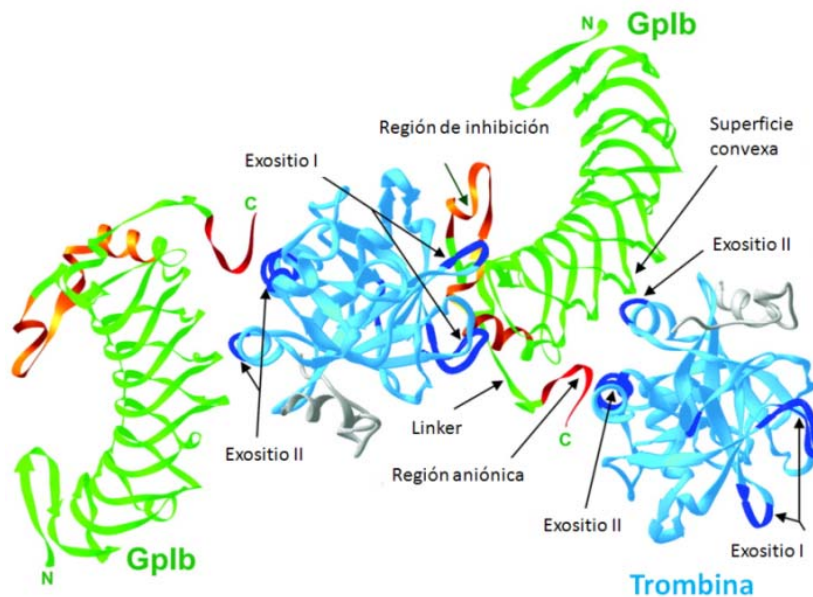
Como consecuencia de esta unión el exosito I queda bloqueado, impidiéndose el reconocimiento de los sustratos procoagulantes como el fibrinógeno, los factores V y VIII y los PARs. De esta forma, la estructura del complejo ofrece una explicación inmediata de por qué los sustratos procoagulantes no pueden ser procesados por la proteasa unida a su receptor endotelial [Fuentes-Prior, Iwanaga, *et al.*, 2000]. Por otra parte, regiones expuestas en los dominios EGF4 y EGF5 enfrentadas al sitio activo de la trombina parecen ser importantes sitios de unión a los sustratos del complejo trombina-TM (PC, TAFI). Se ha predicho que interacciones TM-sustrato, fundamentalmente de tipo electrostático, permiten el alineamiento de los mismos de manera que presentan sus sitios de corte a la trombina unida a la TM, permitiendo así su rápido procesamiento [Fuentes-Prior, Iwanaga, *et al.*, 2000].

#### **1.7.1.2 Glicoproteína de plaquetas GP Ib-IX-V**

Además de los receptores PARs, la trombina posee otro receptor muy importante en la superficie de las plaquetas, el complejo formado por las glicoproteínas Ib, IX y V (GPIb-IX-V). El papel de la proteasa unida a este receptor no se ha esclarecido completamente, pero se sabe que la formación de este complejo es esencial para el inicio de la actividad procoagulante de las plaquetas, induciendo su agregación y activación [De Marco, Mazzucato, *et al.*, 1991, Dormann, Clemetson, *et al.*, 2000], y que la unión defectuosa de la trombina al complejo GPIb-IX-V está asociada con diferentes patologías, como el síndrome de Bernard-Soulier [Berndt, Fournier, *et al.*, 1989]. Por otra parte, se ha propuesto que GPIb $\alpha$  funciona como un cofactor que modula la actividad de la trombina en el procesamiento y activación del PAR1 [Coughlin, 2005].

Los resultados de varios estudios bioquímicos sugieren que la trombina se une al dominio extracelular N-terminal de la subunidad GPIb $\alpha$  [Okumura, Hasitz, *et al.*, 1978]. En concreto, la región aniónica C-terminal, que incluye los residuos Asp<sup>269</sup>-Asp<sup>287</sup> es crítica para esta interacción [De Cristofaro, De Candia, *et al.*, 2001, De Marco, Mazzucato, *et al.*, 1994]. La estructura cristalina del complejo GPIb $\alpha$ -trombina reveló dos sitios de unión claramente diferenciados. La primera región de contacto es dominada por interacciones electrostáticas, e implica el exosito I de la trombina (lazo 70-80) y la región de la GPIb $\alpha$  que abarca el extremo C-terminal de la región rica en leucinas (LRR) junto con el lazo entre el puente disulfuro Cys<sup>209</sup>-Cys<sup>264</sup> (ver figura 1.12). La segunda superficie de interacción se establece entre el exosito II de una segunda molécula de trombina y dos zonas adyacentes de la GPIb $\alpha$ : una región aniónica

sulfatada, y una hélice  $\alpha$  corta (Arg<sup>123</sup>-Leu<sup>129</sup>), situadas en la superficie convexa del dominio LRR (ver Figura 1.12). En esta región predominan los puentes de hidrógeno entre la región aniónica de la GPIb $\alpha$  y los residuos básicos del exosítio II de la trombina. Además, los residuos sulfatados participan en interacciones iónicas e hidrofóbicas con la proteasa [Dumas, Kumar, *et al.*, 2003].



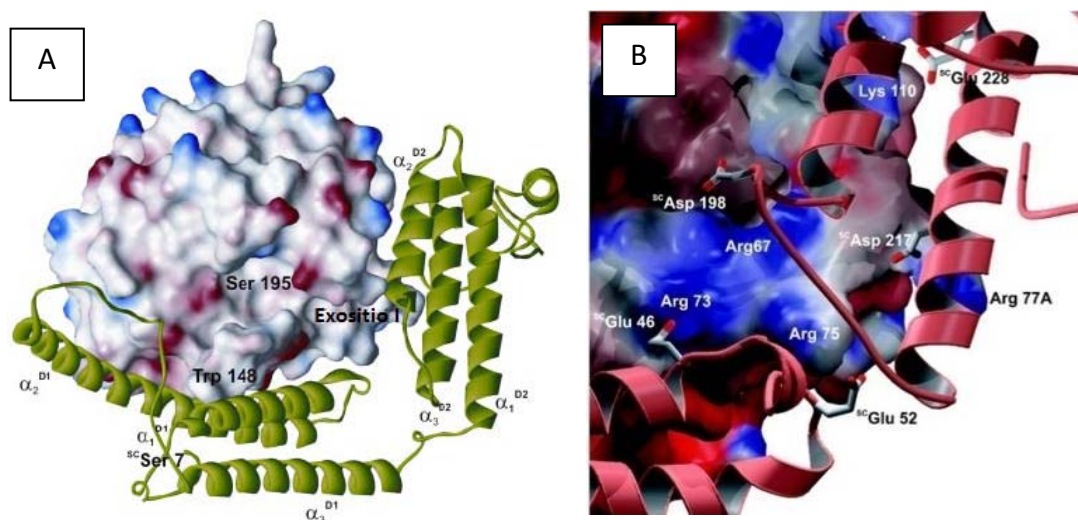
**Figura 1.12 Interacción de la trombina con el dominio GPIb $\alpha$ .** Los dos complejos de la trombina (en azul) unida al GPIb $\alpha$ N (en verde) representados en la figura están relacionados simétricamente. En rojo se representa la región aniónica de la GPIb $\alpha$  (Asp<sup>269</sup>-Tyr<sup>279</sup>) y en amarillo la región que corresponde al péptido Phe<sup>216</sup>-Thr<sup>240</sup>. Ambos exosítios de las moléculas de trombina se representan en azul oscuro, y en gris se muestran las cadenas ligeras de la proteasa. En una de las superficies de interacción se establecen contactos de tipo electrostático e hidrofóbico entre los residuos Ser<sup>194</sup>, Glu<sup>225</sup> y Tyr<sup>228</sup> de la subunidad GPIb $\alpha$  y los residuos de trombina del exosítio I (Lys<sup>36</sup>, Arg<sup>77A</sup> y Lys<sup>109</sup>). Los residuos del exosítio II (Arg<sup>101</sup>, Arg<sup>126</sup>, Arg<sup>233</sup> y Lys<sup>240</sup>) de la trombina participan en puentes de hidrógeno y contactos hidrofóbicos con los residuos de la GPIb $\alpha$  (Leu<sup>275</sup>-Asp<sup>277</sup>) en la segunda superficie de interacción en la que, entre otros contactos, se forman puentes salinos entre el residuo Tyr<sup>276</sup>(SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y los residuos Arg<sup>126</sup> y Lys<sup>236</sup>. Figura adaptada de [Dumas, Kumar, *et al.*, 2003].

### 1.7.2 El activador de la protrombina de *Staphylococcus aureus*, la estafilocoagulasa

Se conoce desde hace varias décadas que algunas cepas de *Staphylococcus aureus* son capaces de coagular el plasma sanguíneo [Korzeniowski, 1992]. Esta propiedad es conferida por un cofactor *sui generis* secretado por la bacteria, la estafilocoagulasa (SC), la cual forma un complejo de alta afinidad con la (pro)trombina que reconoce y procesa al fibrinógeno como único sustrato. Sin embargo, a diferencia del activador fisiológico de la protrombina, el complejo protrombinasa, la SC carece de actividad proteolítica intrínseca. El mecanismo de activación de la protrombina mediado por la SC se basa en la estabilización de los lazos que rodean al sitio activo de la proteasa (Figura 1.13), seguido de la introducción de su extremo N-

terminal, Ile<sup>1</sup>, en el llamado "bolsillo de la Ile<sup>16</sup>" (porque acomoda al residuo N-terminal Ile<sup>16</sup> o similar en los dominios catalíticos de la proteasas de la familia de la tripsina, una vez activadas).

La SC consta de dos dominios N-terminales semejantes de tipo todo- $\alpha$ , denominados D1 y D2. Las tres hélices principales que conforman el dominio D2 cubren completamente el exosito I de la (pre)trombina, de modo que el lazo 70-80 de la misma queda anclado entre los surcos de las hélices  $\alpha_1^{D2}$  y  $\alpha_2^{D2}$  de la estafilocoagulasa. Las regiones que interaccionan están principalmente interconectadas por varios puentes de hidrógeno y salinos fuertes [Friedrich, Panizzi, *et al.*, 2003, Panizzi, Friedrich, *et al.*, 2006].



**Figura 1.13 Estructura de la SC y mecanismo de activación de la protrombina.** **A.** Estructura cristalográfica del complejo SC(1-325)-trombina- $\alpha$  humana [Friedrich, Panizzi, *et al.*, 2003]. Los dominios N-terminales de la SC (D1, hélices  $\alpha_1^{D1}$  a  $\alpha_3^{D1}$  y D2, hélices  $\alpha_1^{D2}$  a  $\alpha_3^{D2}$ ) se muestran en verde. La trombina es representada como una superficie sólida a través de su potencial electrostático, en la que se indican el exosito I, el sitio activo (Ser<sup>195</sup>), y el lazo 149 (Trp<sup>148</sup>). **B.** Representación en detalle de la interacción entre el proexosito I de la pretrombina-2 humana y la SC. El proexosito I y su entorno se muestran centrados en los cuatro residuos de arginina específicos de la trombina (Arg<sup>67</sup>, Arg<sup>73</sup>, Arg<sup>75</sup> y Arg<sup>77A</sup>), y coloreada de acuerdo con el potencial electrostático de superficie calculado para la superficie de la pretrombina-2 sola (rojo, negativo; azul, positivo). La cadena lateral de la Arg<sup>77A</sup> de la pretrombina se ancla entre los grupos carboxilato de los residuos ácidos estrictamente conservados Glu<sup>213</sup> y Asp<sup>217</sup> de la SC, y los residuos a su alrededor establecen otras interacciones intermoleculares electrostáticas fuertes. Los segmentos de contacto de la estafilocoagulasa, formados básicamente por las hélices  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  del dominio D2 se muestran con sus cadenas laterales ácidas en código de color (carbono, blanco; oxígeno, rojo). Figura adaptada de [Friedrich, Panizzi, *et al.*, 2003].

La formación de este complejo es esencial para generar un sitio de unión de alta afinidad específico para el fibrinógeno en la SC. Así, paradójicamente, la ocupación del exosito I de la trombina por la SC conduce a un aumento en la especificidad de la pro(trombina) por su sustrato, el fibrinógeno [Friedrich, Panizzi, *et al.*, 2003, Panizzi, Friedrich, *et al.*, 2006, Friedrich, Panizzi, *et al.*, 2006].

### 1.7.3 Interacciones con inhibidores

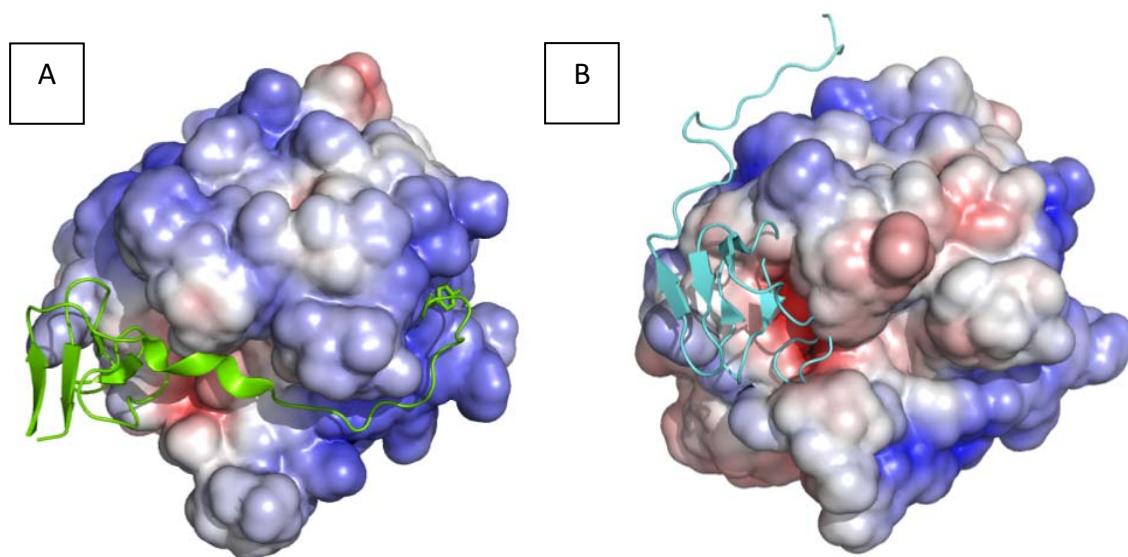
Existe una copiosa información estructural sobre la interacción de diferentes inhibidores derivados de animales hematófagos con la trombina. A continuación se resumen los inhibidores más relevantes de la proteasa, comenzando por el más ampliamente utilizado en el laboratorio, la hirudina. Finalmente, y pese a no ser un inhibidor de la trombina propiamente dicho, sino un cofactor de algunas serpinas como la AT, analizaremos las interacciones de la proteasa con la heparina.

#### 1.7.3.1 Hirudina y hemaedina

La hirudina y la hemaedina son inhibidores no canónicos de la trombina, pertenecientes a la familia I14 en la clasificación MEROPS. Estos inhibidores son producidos por las sanguijuelas *Hirudo medicinalis* y *Haemadipsa sylvestris*, respectivamente, y han sido extensamente estudiados, sobre todo la hirudina, debido a sus propiedades anticoagulantes. La estructura tridimensional del complejo trombina-hirudina determinada por cristalografía de rayos X reveló que el dominio globular N-terminal del inhibidor bloquea el centro activo de la proteasa serínica mediante interacciones hidrofóbicas de sus residuos más N-terminales. Sin embargo, estos residuos no se unen de manera canónica (de forma antiparalela) al segmento Ser<sup>214</sup>-Gly<sup>216</sup>, como lo hacen los sustratos e inhibidores canónicos de las proteasas serínicas de la familia de la tripsina, sino que se insertan de forma paralela a esta cadena  $\beta$  de la proteasa [Rydel, Ravichandran, *et al.*, 1990] (Figura 1.14A).

Por otra parte, el péptido C-terminal de la hirudina se une al exosito I mediante una combinación de interacciones electrostáticas y enlaces de Van der Waals. Los potenciales electrostáticos de las superficies de interacción de la trombina y la hirudina revelan una elevada complementariedad, lo que posiblemente constituye la principal fuerza conductora para la formación del complejo [Stone and Hofsteenge, 1986, Chang, 1990;1989]. La elevada afinidad de la hirudina por la trombina depende, en buena medida, de las interacciones del residuo Tyr<sup>631</sup>, el cual está sulfatado en la mayoría de las isoformas de la hirudina [Stone and Hofsteenge, 1986, Dodt, Machleidt, *et al.*, 1986]. Este residuo forma un puente salino fuerte con el grupo amino- $\epsilon$  de la Lys<sup>81</sup> y establece, además, una amplia red de puentes de hidrógeno que une a los átomos de oxígeno de su grupo sulfato con el grupo hidroxilo de la Tyr<sup>76</sup> y, a través de moléculas de agua, con las cadenas principales de los residuos Asn<sup>78</sup> / Glu<sup>80</sup>,

aumentando en un orden de magnitud la afinidad de la hirudina por la trombina en comparación con la forma no sulfatada [Rydel, Ravichandran, *et al.*, 1990].



**Figura 1.14 Inhibición de la trombina por dos miembros de la familia I14 de inhibidores de peptidasas, la hirudina y la hemadina.** **A.** Estructura tridimensional del complejo trombina·hirudina [Rydel, Ravichandran, *et al.*, 1990]. Los elementos de estructura secundaria del inhibidor se representan en verde. Se observa la interacción del péptido C-terminal con el exosito I de la trombina, mientras que el dominio N-terminal se sitúa sobre el centro activo. **B.** Estructura del complejo de la trombina humana con la hemadina [Richardson, Kroger, *et al.*, 2000], cuya estructura secundaria se muestra en color azul claro. Se puede observar en este caso que el extremo C-terminal cubre el exosito II de la trombina. Las figuras fueron generadas utilizando PyMol a partir de las estructuras depositadas en el PDB (4HTC y 1E0F, respectivamente). En ambos casos, la molécula de trombina se representa en la orientación estándar mediante su potencial electrostático superficial (azul, positivo; rojo, negativo).

Varios estudios estructurales y funcionales [Corral-Rodriguez, Macedo-Ribeiro, *et al.*, 2009, Jackman, Parry, *et al.*, 1992, Myles, Le Bonniec, *et al.*, 2001] han permitido establecer el mecanismo de unión de la hirudina a la trombina. La formación del complejo conlleva, en primer lugar, la aproximación del inhibidor hacia el exosito I de la trombina, dirigido por su complementariedad electrostática con el extremo C-terminal de la hirudina. A esto le sigue la unión mediante interacciones de Van der Waals e iónicas de este péptido ácido al exosito I. Esta unión, limitante de la velocidad de formación del complejo, provoca cambios conformacionales en la trombina [Mao, Yates, *et al.*, 1988, Konno, Fenton, *et al.*, 1988]. La formación de este complejo inicial es esencial para colocar el tripéptido N-terminal de la hirudina a una distancia y orientación apropiadas para su inserción rápida en el surco del centro activo de la proteinasa, reforzada por interacciones adicionales con los residuos del mismo [Corral-Rodriguez, Macedo-Ribeiro, *et al.*, 2010]. De interés farmacológico, cabe destacar que la unión de la cola C-terminal de la hirudina al exosito I de la trombina inhibe la activación del Fbg [Krstenansky, Owen, *et al.*, 1987, Krstenansky and Mao, 1987, Naski, Fenton, *et al.*, 1990], la

activación de las plaquetas mediada por los PARs [Vu, Hung, *et al.*, 1991, Jandrot-Perrus, Huisse, *et al.*, 1991], y la unión al receptor endotelial de la trombina, la trombomodulina [Tsiang, Lentz, *et al.*, 1990].

La comparación de la hemadina con la hirudina revela que ambos inhibidores comparten un modo de unión no canónico de sus péptidos N-terminales al centro activo de la trombina. En efecto, en ambos complejos los tres primeros residuos del extremo N-terminal se insertan en el surco del centro activo de la trombina, formando hojas  $\beta$  paralelas con los residuos Ser<sup>214</sup>-Gly<sup>216</sup> de la trombina (Figura 1.14B). Sin embargo, los dos inhibidores difieren drásticamente en la localización de sus colas ácidas C-terminales. Como hemos señalado más arriba, la hirudina se une al exosito I de la trombina. Sin embargo, la cola C-terminal de la hemadina interacciona con el exosito II [Richardson, Kroger, *et al.*, 2000, Richardson, Fuentes-Prior, *et al.*, 2002]. Esta superficie de la trombina está principalmente poblada por residuos cargados positivamente (por ejemplo, Arg<sup>93</sup>, Arg<sup>97</sup>, Arg<sup>101</sup>, Arg<sup>233</sup> y Lys<sup>240</sup>), mientras que el extremo C-terminal de la hemadina posee un gran número de residuos con carga negativa (8 de los 19 residuos de esta región son aspartatos o glutamatos). A pesar de esta acusada complementariedad electrostática, los únicos puentes salinos fuertes que se establecen entre ambas moléculas son los que conectan el grupo carboxilo del Glu<sup>491</sup> con los grupos guanidinio de las argininas 93 y 101.

#### **1.7.3.2 Otros inhibidores derivados de animales hematófagos**

Otros inhibidores menos conocidos interaccionan con la trombina a través del sitio activo y/o el exosito I. Entre ellos encontramos a la rodina, un inhibidor específico de la trombina aislado del insecto hematófago *Rhodnius prolixus*. La rodina, que pertenece a la familia I2 (Kazal), interacciona a través de su dominio N-terminal de manera canónica con el sitio activo, y a través de su dominio C-terminal con el exosito I de la trombina [van de Loch, Lamba, *et al.*, 1995].

La ornitorina [van de Loch, Stubbs, *et al.*, 1996] y la boofilina [Corral-Rodriguez, Macedo-Ribeiro, *et al.*, 2009, Macedo-Ribeiro, Almeida, *et al.*, 2008] son inhibidores tipo Kunitz (familia I1) de la trombina presentes en la saliva de la garrapata blanda *Ornithodoros moubata* y de la garrapata dura *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, respectivamente. Ambos inhibidores han sido caracterizados en sus complejos con la trombina bovina, observándose que el dominio

Kunitz N-terminal del inhibidor bloquea al centro activo de la proteasa, mientras que el dominio C-terminal cubre el exosito I.

La triabina es un potente inhibidor de la trombina aislado de la saliva del insecto *Triatoma pallidipennis*. La resolución de la estructura cristalina del complejo trombina-triabina [Fuentes-Prior, Noeske-Jungblut, *et al.*, 1997] reveló que este inhibidor se une a la proteasa exclusivamente a través de su exosito I, quedando libre el sitio activo. Sin embargo, y resaltando el papel crítico de esta región en el reconocimiento de sustratos fisiológicos, la triabina unida a trombina inhibe de forma potente la activación del fibrinógeno y la agregación plaquetaria.

Por último, recientemente ha sido revelado el mecanismo de inhibición de la trombina por la anofelina, un polipéptido relativamente pequeño producido por los vectores de la malaria, los mosquitos del género *Anopheles*. A diferencia de los inhibidores anteriormente mencionados, la estructura cristalina del complejo trombina-anofelina mostró que la región más N-terminal del inhibidor interacciona con el exosito I de la trombina, mientras que los residuos más C-terminales cubren el sitio activo de la proteasa. En esta orientación, que es exactamente la opuesta a sustratos productivos de la proteasa, la anofelina no puede ser procesada, explicando así la formación de un complejo estable de alta afinidad [Figueiredo, de Sanctis, *et al.*, 2012].

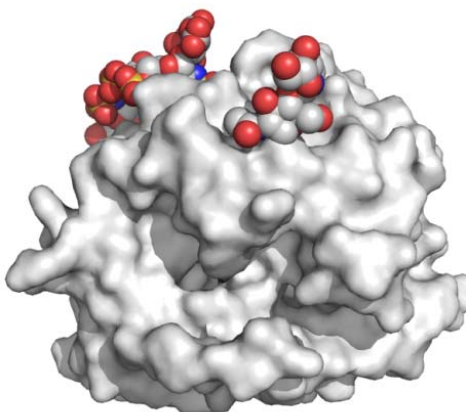
### **1.7.3.3 Heparina**

La heparina es un glicosaminoglicano formado esencialmente por la repetición de un disacárido de ácido urónico y glucosamina; el peso molecular de la heparina nativa varía entre 3 y 30 kDa. Este disacárido es sulfatado de forma variable, lo que le confiere al polímero resultante una marcada carga negativa. La heparina actúa como cofactor de la antitrombina, acelerando marcadamente la inhibición de la trombina así como de los factores IXa, Xa, XIa y XIIa de la cascada de la coagulación. Desde su descubrimiento y caracterización en las décadas de 1930 y 1940, la heparina y sus derivados se han convertido en uno de los principales fármacos empleados en el tratamiento de la trombosis venosa.

La estructura de la trombina unida a un fragmento de la heparina [Carter, Cama, *et al.*, 2005] revela un modelo de unión relativamente inespecífico en el que el sitio de interacción está compuesto por al menos 6 unidades de monosacárido. La unión a la proteasa es



principalmente de naturaleza iónica, e involucra a cinco o seis grupos cargados negativamente de la heparina (Figura 1.15).



**Figura 1.15 Estructura tridimensional del complejo trombina-heparina.** Se muestra la superficie accesible al solvente de la trombina, en la orientación estándar. En esferas de color (código: carbono, blanco; oxígeno, rojo; azufre, amarillo; nitrógeno, azul) se representan los átomos del fragmento de heparina que se une a la proteasa, compuesto por seis monosacáridos [Carter, Cama, *et al.*, 2005]. La figura ha sido generada a partir de las coordenadas depositadas en el PDB (1XMN), utilizando PyMol.

Los residuos de trombina que interaccionan con la heparina se localizan en el exosítio II, y la relevancia de algunos de ellos ( $\text{Arg}^{93}$ ,  $\text{Arg}^{101}$ ,  $\text{Arg}^{233}$ ,  $\text{Lys}^{235}$ ,  $\text{Lys}^{236}$ , y  $\text{Lys}^{240}$ ) ha sido confirmada por estudios de mutagénesis dirigida [Gan, Li, *et al.*, 1994, Sheehan and Sadler, 1994, Tsiang, Jain, *et al.*, 1997].

## 1.7.4 Reconocimiento de sustratos fisiológicos

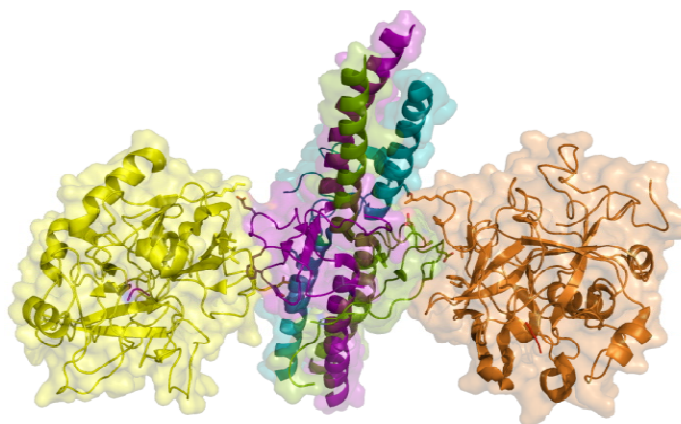
### 1.7.4.1 Reconocimiento del fibrinógeno

La interacción entre la trombina y la región central E del fibrinógeno ha acaparado mucha atención debido a su importancia en la conversión de fibrinógeno a fibrina y en la regulación de la actividad de la trombina *in vivo*. Las interacciones del fibrinógeno con residuos específicos localizados en el exosítio I de la trombina son necesarias para la liberación de los fibrinopéptidos A y B y la consecuente generación de fibrina. El sitio de unión del Fbg al exosítio I de la trombina se localiza en la parte central de esta región de la molécula, según revela la estructura del complejo obtenida mediante cristalografía de rayos X (Figura 1.16).

A pesar de que la resolución a la que se resolvió la estructura de este complejo es más bien baja (3.65 Å), la misma permitió discernir las interacciones más importantes entre el fragmento E del fibrinógeno y el exosítio I de la trombina. De los residuos cargados del exosítio I, únicamente la  $\text{Arg}^{77A}$  y la  $\text{Lys}^{110}$  están orientadas de forma tal que podrían formar puentes



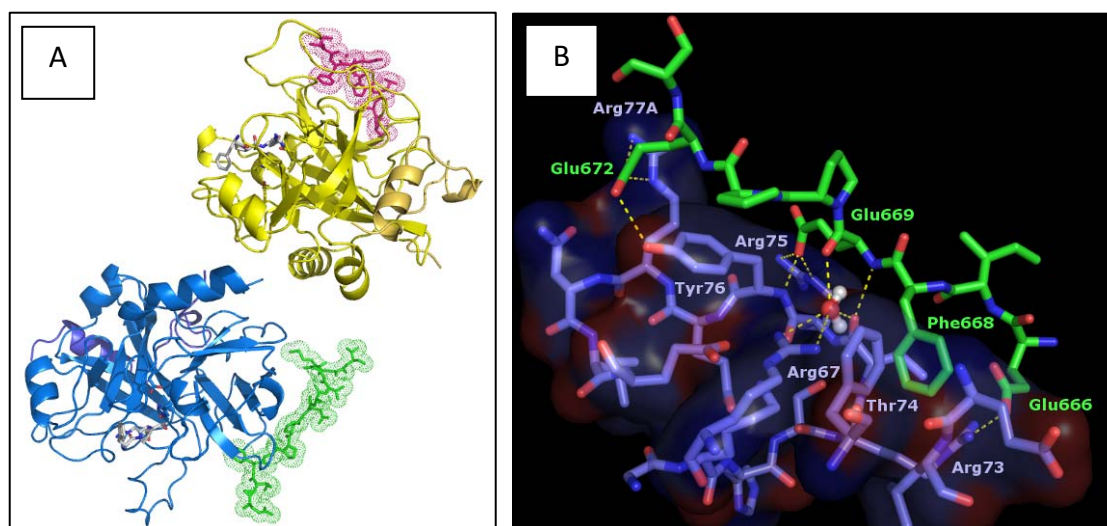
salinos con residuos complementarios del fibrinógeno. Aunque sólo representan una pequeña parte de las interacciones en la interfase trombina-fibrinógeno, que es dominada por contactos de Van der Waals, estos enlaces parecen ser importantes para la aproximación inicial de las dos moléculas y la correcta orientación de los fibrinopéptidos en el sitio activo de la proteasa [Pechik, Madrazo, *et al.*, 2004].



**Figura 1.16 Estructura tridimensional del complejo entre el fragmento E (sin los fibrinopéptidos) del fibrinógeno y el exosito I de la trombina humana.** Se representa la estructura secundaria de las moléculas en colores sólidos, envueltas por la superficie accesible por el disolvente, en color transparente. Las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del fibrinógeno se muestran en verde, violeta y azul, respectivamente, y las moléculas de trombina se representan en amarillo y naranja. La superficie de interacción está dominada fundamentalmente por contactos hidrofóbicos entre los residuos apolares de ambas superficies, acompañados por algunos puentes salinos y puentes de hidrógeno entre residuos con cargas opuestas.

#### 1.7.4.2 Activación del factor V

Como se mencionó en el epígrafe 1.5, el FV es activado por la trombina mediante cortes proteolíticos entre los residuos Arg<sup>709</sup>-Ser<sup>710</sup> (entre los dominios A2 y B), Arg<sup>1018</sup>-Thr<sup>1019</sup> (dentro del dominio B) y Arg<sup>1545</sup>-Ser<sup>1546</sup> (en el extremo N-terminal del dominio A3), estableciendo un lazo de retroalimentación positiva esencial para una rápida generación de la proteinasa y amplificando así el proceso de coagulación sanguínea. Las bases estructurales para la activación del FV mediada por la trombina fueron presentadas recientemente por nuestro grupo [Corral-Rodriguez, Bock, *et al.*, 2011]. Empleando los conectores recombinantes FVa2 (residuos 657-709) y FVa3 (residuos 1481-1545), y mediante estudios de resonancia de plasmones de superficie (SPR) y de cristalografía, se evidenció que el conector a2 interactúa principalmente con el exosito I a través de la región similar a la cola C-terminal de la hirudina presente en el FVa2 (Figura 1.17A); mientras que el FVa3 parece interactuar con ambos exositos de la trombina.

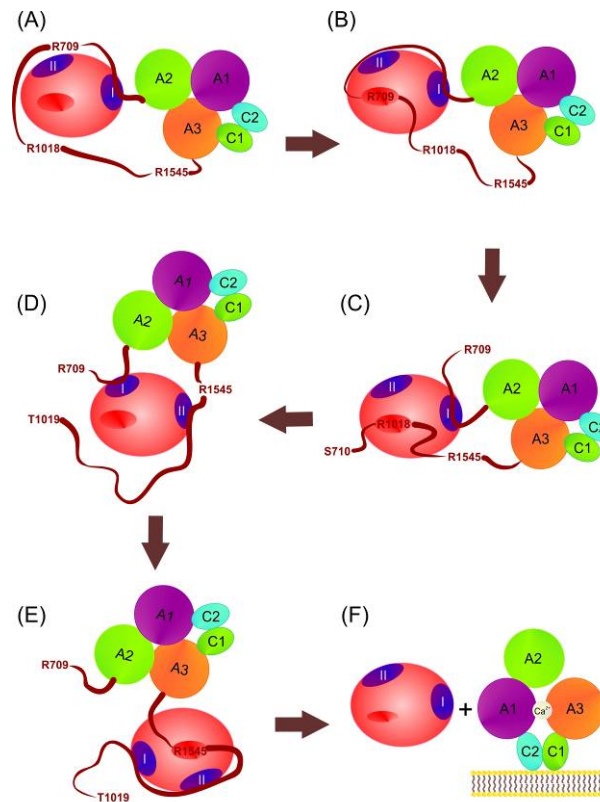


**Figura 1.17 Estructura 3D del complejo entre el FVa2 y el exosito I de la trombina humana.** **A.** Los contactos entre las dos moléculas de trombina se establecen a través de los exositos II y las regiones colindantes de ambas moléculas. Se representan mediante *cartoons* las moléculas de trombina (en color azul y amarillo), y mediante *sticks* los residuos Glu<sup>666</sup>-Glu<sup>672</sup> del conector FVa2 (en verde y morado), las fuerzas de Van der Waals de los residuos se indican con el mismo color. **B.** Vista detallada del exosito I de la proteinasa en el complejo FVa2-trombina-FPR. La secuencia similar a la hirudina más próxima al extremo N-terminal del FVa2, Glu<sup>666</sup>-Glu<sup>672</sup>, se une a lo largo del exosito I de la trombina. En particular la cadena lateral de la Phe<sup>668</sup> del cofactor ocupa un bolsillo hidrofóbico formado por átomos tanto de la cadena principal como de las cadenas laterales de los residuos Phe<sup>34</sup>, Leu<sup>40</sup>, Arg<sup>67</sup>, Arg<sup>73</sup> y Thr<sup>74</sup>. Se observa también que el residuo Glu<sup>669</sup> forma un puente salino fuerte con la Arg<sup>75</sup> y además un enlace de hidrógeno con la Tyr<sup>76</sup>, mientras que los residuos del cofactor Pro<sup>670</sup> a Ser<sup>673</sup> forman un arco que cubre la cadena lateral de la Tyr<sup>76</sup> de la trombina. Se muestran únicamente los residuos del lazo 70-80 de la trombina y algunas cadenas laterales del lazo 37 vecino. Los residuos de trombina se colorean en azul violáceo (carbono), azul intenso (nitrógeno) y rojo (oxígeno). Los residuos del FV se presentan en color verde (carbono), azul intenso (nitrógeno) o rojo (oxígeno). Las interacciones electrostáticas entre residuos se indican mediante líneas amarillas discontinuas. Modificado de [Corral-Rodríguez, Bock, *et al.*, 2011].

Los resultados estructurales obtenidos por nuestro grupo sugieren una explicación del mecanismo cinéticamente preferido -y bioquímicamente caracterizado- de la activación del FV [Suzuki, Dahlback, *et al.*, 1982, Segers, Dahlback, *et al.*, 2007, Keller, Ortel, *et al.*, 1995]. El modelo de activación propone que el reconocimiento del sitio de corte Arg<sup>709</sup>-Ser<sup>710</sup> es facilitado principalmente por las interacciones de la trombina con el segmento Glu<sup>667</sup>-Glu<sup>672</sup> del cofactor, semejante a la cola C-terminal de la hirudina (Figura 1.18A). Una vez fijado al exosito I, la parte situada en el extremo más C-terminal del conector ácido a2, rodea a la proteasa dirigida por las interacciones débiles con los residuos del exosito II. De esta manera, el enlace peptídico Arg<sup>709</sup>-Ser<sup>710</sup> se presenta a la maquinaria catalítica en una conformación óptima para ser procesado (Figura 1.18B). Tras el procesamiento de este sitio, la trombina permanece unida a la molécula del FV procesada en la Arg<sup>709</sup> través del exosito I, de manera que puede acceder al enlace peptídico Arg<sup>1018</sup>-Thr<sup>1019</sup> que, tras el primer corte, queda ahora completamente expuesto (Figura 1.18C). La hidrólisis rápida en este segundo sitio libera la región Ser<sup>710</sup>-Arg<sup>1018</sup> (fragmento E) y facilita el corte del enlace peptídico en el extremo C-terminal, Arg<sup>1545</sup>-Ser<sup>1546</sup>

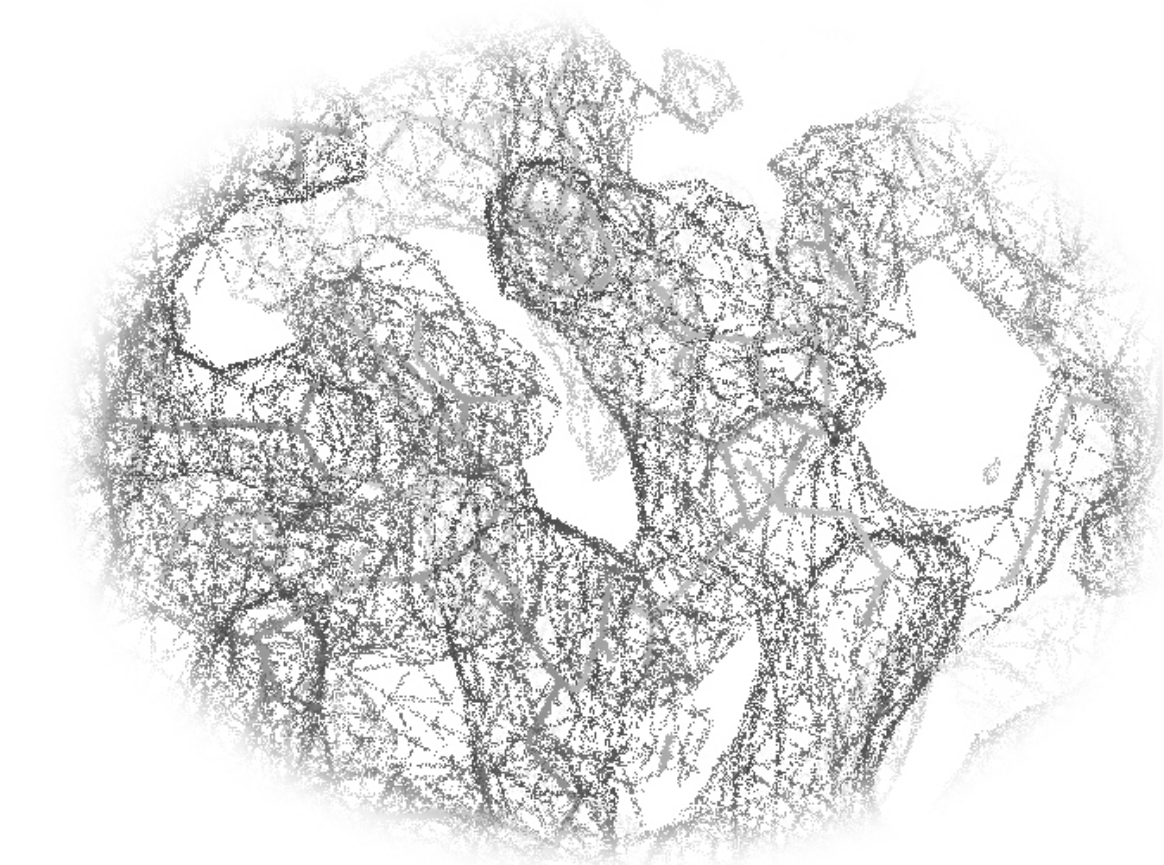
[Thorelli, Kaufman, *et al.*, 1997], probablemente porque se facilita el acceso de la proteasa (Figura 1.18D). Posiblemente, la secuencia ácida en el extremo C-terminal del FVa3 se une primero al exosito II, lo cual es seguido del desplazamiento del motivo Glu<sup>667</sup>-Glu<sup>672</sup> del FVa2 del exosito I de la trombina por la región topológicamente equivalente del FVa3 (ubicada entre Asp<sup>1492</sup> y Glu<sup>1501</sup>) (Figura 1.18D-E), y la introducción de la región que incluye el enlace Arg<sup>1545</sup>-Ser<sup>1546</sup> en el surco del centro activo de la trombina. Finalmente, el corte de este enlace peptídico libera al fragmento C1 (Thr<sup>1019</sup>-Arg<sup>1545</sup>) generándose el cofactor completamente activo (Figura 1.18F).

Estas investigaciones de estructura y función establecen de manera inequívoca que el extremo más N-terminal, de secuencia similar a la hirudina, del FVa2 interacciona con el exosito I de la trombina durante el proceso de activación del cofactor. Además, especulamos que este modelo de unión es común al FVa3 y al FVIIIa1-a3, aunque la falta de similitud significativa de estas secuencias con el FVa2 impide una asignación de los residuos que pueden ocupar las posiciones equivalentes a, por ejemplo, la Phe<sup>668</sup>.



**Figura 1.18 Representación esquemática del mecanismo de activación propuesto del factor V humano.** Los dominios globulares del FV se representan según la estructura cristalina publicada [Adams, Hockin, *et al.*, 2004], y los exositos de la trombina se muestran como óvalos azules etiquetados. En primer lugar, la secuencia del FVa2 similar a la hirudina, Glu<sup>666</sup>-Glu<sup>672</sup>, se une al exosito I de la trombina (A). Tras este acoplamiento al exosito, la secuencia en el extremo más C-terminal del conector entre los dominios A2-B, rodea la parte “superior” de la molécula de trombina, de manera que pasa cerca pero no establece interacciones importantes con los residuos del exosito II (B). De esta manera, el enlace peptídico de activación Arg<sup>709</sup>-Ser<sup>710</sup> se presenta al centro activo en la conformación adecuada para la proteólisis. La hidrólisis en este sitio genera la cadena pesada A1-A2-a2 del FVa y la repulsión electrostática de los segmentos Asp<sup>659</sup>-Asp<sup>663</sup> y Glu<sup>719</sup>-Glu<sup>722</sup> fuerza la rápida salida de las secuencias alrededor del sitio de corte de la hendidura del centro activo. A continuación, la trombina accede al enlace Arg<sup>1018</sup>-Thr<sup>1019</sup> ahora completamente accesible, mientras que permanece todavía unida al cofactor a través del motivo similar a la hirudina del FVa2 (C). Este segundo corte libera la región Ser<sup>710</sup>-Arg<sup>1018</sup> del cofactor (fragmento E). La hidrólisis del enlace situado en el extremo más C-terminal, Arg<sup>1545</sup>-Ser<sup>1546</sup>, requiere de la transferencia de la proteinasa al conector entre los dominios B-A3, esencial para la activación del FV mediada por la trombina [Marquette, Pittman, *et al.*, 1995]. La transferencia posiblemente ocurre a través de un complejo intermediario en el que el motivo ácido situado en el extremo más C-terminal del FVa3 contacta con el exosito II de la trombina (D), seguido del desplazamiento de la secuencia Glu<sup>666</sup>-Glu<sup>672</sup> del exosito I por la secuencia topológicamente equivalente en el FVa3 (situada entre los residuos Asp<sup>1492</sup> y Glu<sup>1501</sup>). En el complejo de Michaelis-Menten resultante, el enlace peptídico Arg<sup>1545</sup>-Ser<sup>1546</sup> se inserta en la cavidad del centro activo de la trombina (E). Finalmente, la proteólisis en este sitio libera la región Thr<sup>1019</sup>-Arg<sup>1545</sup> altamente glicosidada (fragmento C1), y genera un cofactor completamente funcional. Modificado de [Corral-Rodríguez, Bock, *et al.*, 2011].





## 2. OBJETIVOS



La elevada incidencia de las enfermedades cardiovasculares exige estudiar a profundidad las complejas reacciones bioquímicas que conducen a la formación de trombos en condiciones patofisiológicas, y en particular del sistema de coagulación sanguínea con el objetivo de disponer de nuevas dianas terapéuticas entre proteínas clave de este sistema. La trombina- $\alpha$  es una proteasa serínica esencial dentro de la cascada de coagulación gracias a sus múltiples funciones tanto pro- como anticoagulantes. Por esta razón, es imprescindible comprender la dinámica molecular de esta proteína y las interacciones con sus sustratos fisiológicos. En este sentido, para dos de sus sustratos más importantes dentro del sistema de la coagulación sanguínea, el factor VIII y el receptor PAR1, existe una serie de evidencias que sugieren interacciones a través de los exositos I y II de la trombina. Sin embargo, los mecanismos moleculares de estas interacciones aún no han sido dilucidados.

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la estructura y función de la trombina- $\alpha$  humana, y elucidar las bases moleculares del mecanismo de activación del factor VIII de la coagulación, y del receptor de plaquetas PAR1.

Así, se establecieron los siguientes objetivos:

- 1.- Caracterizar la termoestabilidad y la plasticidad de la trombina mediante las técnicas biofísicas y bioquímicas de microcalorimetría (1.1), termofluorescencia (1.2), proteólisis limitada (1.3) y cristalografía de rayos X (1.4). Dentro de este objetivo interesa analizar los cambios en la conformación de la trombina en presencia de diferentes ligandos específicos; uno de los puntos esenciales es cristalizar la proteasa en presencia de estos ligandos, resolver las estructuras tridimensionales correspondientes, e interpretarlas.
- 2.- Analizar las interacciones de la trombina con el dominio extracelular del receptor PAR1. Para ello, dos variantes del dominio extracelular del receptor, que incluyen los residuos Thr<sup>37</sup>-Thr<sup>102</sup> y Ser<sup>42</sup>-Thr<sup>102</sup>, serán sobreexpresadas como proteínas recombinantes y purificadas (2.1). Estas formas recombinantes del ectodominio del receptor serán usadas para resolver las estructuras tridimensionales de sus complejos con la proteasa activadora mediante cristalografía de rayos X, para caracterizar así las bases moleculares del mecanismo de interacción entre estas dos proteínas (2.2).



3.- Caracterizar las interacciones de la trombina con los conectores interdominios del factor VIII. Para ello se establecerán protocolos de expresión y purificación de los fragmentos recombinantes del FVIII que corresponden a los conectores ácidos entre sus dominios A1 y A2 (FVIIIa1), A2 y B (FVIIIa2), y B y A3 (FVIIIa3) (3.1); para posteriormente analizar las interacciones de estas regiones con la trombina mediante cristalografía de rayos X (3.2) y resonancia magnética nuclear (3.3). Finalmente, se pretende determinar el papel de los residuos aminoacídicos esenciales del FVIII en el mecanismo de activación mediado por la trombina (3.4).



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS



### 3.1 MATERIALES Y PREPARACIONES ESPECÍFICAS

Para los diferentes estudios realizados a lo largo de esta investigación se requirieron productos específicos, así como la preparación particular de algunas soluciones o proteínas, como se detalla más abajo en este apartado. La trombina- $\alpha$  (HCT-0020) y el factor de la coagulación X (FX) (HCT-0050) humanos, así como la FPR-clorometilcetona (FPR) (FPRCK-01) se obtuvieron de Haematologic Technologies Inc. El péptido C-terminal (Gly<sup>54</sup>-Gln<sup>65</sup>) de la hirudina con la Tyr<sup>63</sup> sulfatada (H6894), el hidrocloreto de benzamidina (434760), el fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) (93482), la albúmina de suero bovino (BSA) (A2153) y el ácido trimetilsilil propianoico (TSP) (269913) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, y las endoproteinasas tripsina (11 418 475 001), Arg-C (11 370 529 001) y Asp-N (11 054 589 001) de Roche Diagnostics. El fluoróforo SYPRO Orange (S-6651) se obtuvo de Invitrogen; mientras que el cloruro de amonio-<sup>15</sup>N (CN80P) y la <sup>13</sup>C D-glucosa (CC860P) de CortecNet. El hidrocloreto de tris-carboxietil fosfina (TCEP) (20490) se adquirió de Thermo Scientific y el agua deuterada (Deuterium oxide) de Deutero GmbH.

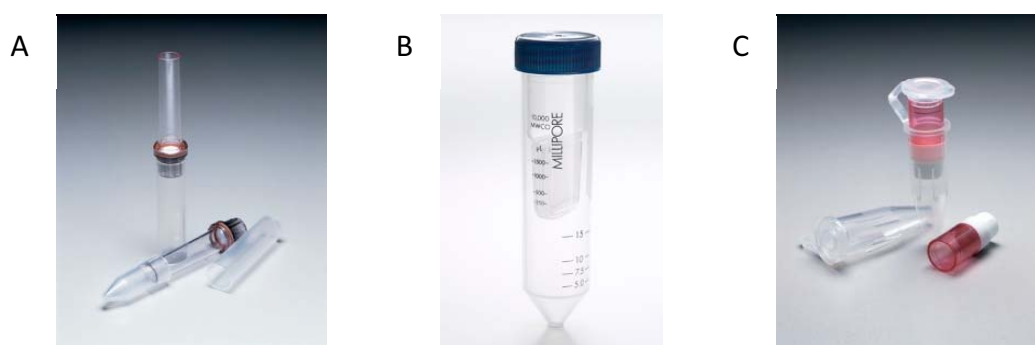
#### 3.1.1 Preparación de variantes de trombina unida a diferentes ligandos

Para inhibir la trombina con FPR se tomó 1 mg de trombina- $\alpha$  humana (trombina) disuelta en 20% de glicerol, y se llevó a 1 ml con 50 mM Tris, pH 8.0. A esta disolución se le añadieron 12  $\mu$ l de 20 mM FPR, de modo que la relación molar entre la proteasa y el inhibidor fuese de aproximadamente 1:10. (Las relaciones molares de 1:5 y 1:1 se prepararon de forma similar, añadiendo el volumen de FPR correspondiente). La mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, y el exceso de FPR se eliminó mediante al menos cuatro ciclos de dilución en 2 ml de tampón correspondiente (generalmente HEPES/NaCl, pH 6.0), seguidos de la concentración de la solución de trombina-FPR en dispositivos Amicon Ultra-15 o Centricon (Millipore) (ver Figura 3.1), con una membrana de tamaño de poro de peso molecular nominal de 10 kDa.

En el caso de los ligandos PMSF, benzamidina y del fragmento C-terminal (Gly<sup>54</sup>-Gln<sup>65</sup>) de la hirudina con la Tyr<sup>63</sup> sulfatada (de ahora en adelante llamada Hir-C) se prepararon

directamente en el tampón requerido para los diferentes ensayos y se adicionaron a la solución de trombina previamente dializada en este tampón, en la relación molar deseada.

Para comprobar la eficiencia de la inactivación de la trombina con los inhibidores irreversibles, FPR y PMSF, se analizó su actividad frente al sustrato cromogénico S-2238 (Chromogenix, Milán, Italia). Muestras de las proteasas analizadas (2  $\mu$ l de una disolución a 100  $\mu$ g/ml) se incubaron con 1 ml de 100  $\mu$ M S-2238 en 50 mM Tris, pH 8.0, y se midió la variación de la absorbancia a 405 nm en función del tiempo en cubetas acrílicas. Como blanco utilizamos una disolución 100  $\mu$ M de S-2238 en el tampón de reacción.



**Figura 3.1 Dispositivos empleados para la concentración de las soluciones de proteínas.** Estos dispositivos tienen una membrana de baja adherencia de un determinado tamaño de poro. Las disoluciones de proteína se colocan en la parte superior, y al ser centrifugadas en estos dispositivos, las moléculas quedan retenidas en la parte superior, o pasan a través de la membrana, dependiendo del tamaño de los poros de la membrana. **A.** Dispositivo Centricon, que permite concentrar un volumen inicial de 2 ml hasta 40  $\mu$ l, **B.** Amicon, permite trabajar con volúmenes de 15 ml y consigue un volumen final de 200  $\mu$ l. **C.** Microcon, para volúmenes muy pequeños, tiene capacidad para un volumen máximo de 500  $\mu$ l y concentra hasta alcanzar un volumen final de 10  $\mu$ l. (Todos estos dispositivos son producidos por Millipore actualmente una división del Grupo Merck. La figura ha sido tomada de la página web de la compañía; [www.millipore.com](http://www.millipore.com)).

## 3.2 ANÁLISIS BIOQUÍMICOS Y BIOFÍSICOS DE LA TROMBINA

Con el objetivo de evaluar la estabilidad y plasticidad de la trombina a nivel bioquímico y biofísico se realizaron diferentes ensayos de digestión enzimática y de termoestabilidad. A este análisis también contribuyeron las estructuras de la trombina libre resueltas por cristalografía de rayos X (ver epígrafe 3.9).

### 3.2.1 Digestión enzimática de la trombina

La presencia de residuos de arginina expuestos en el lazo 70-80 de la trombina permitió evaluar la estabilidad de la trombina a nivel bioquímico mediante ensayos de digestión enzimática con la endoproteinasa Arg-C, la cual es una cisteín proteasa que hidroliza los enlaces peptídicos Arg-Xxx.

Se realizaron digestiones, por duplicado, de trombina, de trombina inhibida reversiblemente con benzamidina, y de la proteasa inhibida irreversiblemente con FPR. Alícuotas de BSA tratadas exactamente como la trombina fueron usadas como controles. Se digirieron 80  $\mu\text{g}$  de proteína con 0,5  $\mu\text{g}$  de la proteasa Arg-C en un volumen final de 140  $\mu\text{l}$  en el tampón de digestión indicado por el fabricante (Anexo 5) a 37 °C en un bloque térmico (AccuBlock™, Labnet Inc.), y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de digestión (a 0, 15 y 30 min y a 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas). La reacción se detuvo añadiendo 0.5  $\mu\text{l}$  de HCl, 10 N, y los resultados de las reacciones se evaluaron mediante electroforesis en geles de SDS poliacrilamida al 12%.

### 3.2.2 Ensayos de microcalorimetría diferencial (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC)

---

En la última década se han utilizado ensayos basados en la desnaturalización térmica de una proteína para evaluar el efecto de diferentes ligandos y otros factores a la estabilización de la misma. El incremento de la estabilidad se evidencia como un incremento en la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ , *melting temperature*) de la proteína o complejo estudiado. En estos ensayos se calienta gradualmente la proteína, determinándose su  $T_m$  como la temperatura a la cual el 50% de la proteína se desdobra o desnatura, perdiendo su configuración tridimensional natural.

La microcalorimetría diferencial de barrido (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) permite cuantificar la cantidad de calor (energía) necesaria para incrementar la temperatura en la solución de la proteína de interés y en la solución control (tampón) en función de la temperatura. En la DSC se logra determinar en un solo experimento la temperatura de desnaturalización o transición ( $T_m$ ), el cambio en la energía absorbida o entalpía ( $\Delta H$ ) y el cambio en la capacidad calórica ( $\Delta C_p$ ) asociados con el desplegamiento de la proteína. Este incremento en la capacidad calórica es debido principalmente a cambios en la hidratación de las cadenas laterales no polares que están ocultas en el estado nativo de la proteína y que se exponen al solvente en el estado desnaturalizado [Bruylants, Wouters, *et al.*, 2005, Gomez, Hilser, *et al.*, 1995].

Las muestras de trombina a utilizar en estos ensayos se dializaron exhaustivamente en 25 mM PIPES, pH 6.5, 150 mM NaCl empleando dispositivos Amicon Ultra-15 con una

membrana de tamaño de poro de peso molecular nominal de 10 kDa (ver Figura 3.1). La proteinasa se incubó con el ligando respectivo a temperatura ambiente por 30 minutos; en el caso de los ligandos PMSF y del fragmento C-terminal (Gly<sup>54</sup>-Gln<sup>65</sup>) de la hirudina con la Tyr<sup>63</sup> sulfatada se prepararon directamente en el tampón arriba mencionado y se adicionaron posteriormente a la solución dializada de trombina; mientras que la trombina inhibida con FPR se preparó según se indica en el epígrafe 3.1.1.

Para cada ensayo se evaluaron por duplicado muestras recién preparadas de trombina libre o inhibida respectivamente con un exceso molar de los ligandos (1:10), a saber: PMSF, Hir-C, FPR y FPR más Hir-C, a concentraciones aproximadamente de 1 mg/ml (entre 27.5 y 21.7  $\mu$ M). Como control se utilizó en la celda de referencia el filtrado del paso final de diálisis.

Los termogramas de estos experimentos se colectaron utilizando un equipo MicroCal VP DSC (GE Healthcare) desde los 20 hasta los 95 °C, con una velocidad de incremento de 90 °C / hora; y los datos fueron procesados mediante VPViewer2000 DSC y Origin 7.0 (OriginLab, Northampton, MA).

### 3.2.3 Ensayos de termofluorescencia diferencial (*ThermoFluor*®)

---

Esta técnica - también conocida como *Differential Scanning Fluorimetry*, DSF - se basa en los mismos principios bioquímicos y biofísicos de la microcalorimetría diferencial de barrido (DSC, 3.2.2), pero utiliza una molécula fluorescente para detectar la exposición de las regiones hidrofóbicas de la proteína a medida que la proteína se despliega y determinar así la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) [Cummings, Farnum, *et al.*, 2006, Niesen, Berglund, *et al.*, 2007].

En nuestros ensayos de termofluorescencia diferencial la estabilidad térmica de la trombina libre o inhibida como se describe más abajo fue evaluada en placas transparentes de 96 pozos en un sistema iQ5 Real Time PCR (BioRad) registrando la fluorescencia a 545 nm del fluoróforo SYPRO Orange (Invitrogen) en función de la temperatura desde los 20 hasta los 95 °C, con incrementos de 0.5 °C/min.

En un tampón de 50 mM Tris·HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl se evaluaron muestras por triplicado de 20  $\mu$ l de trombina libre (1  $\mu$ M) e inhibidas con diferentes relaciones molares (1:1, 1:5 y 1:10) de benzamidina, Hir-C, FPR y de FPR junto con Hir-C. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos y posteriormente se les agregó una solución de SYPRO

*Orange* a una concentración final de 10X. Se incluyeron controles experimentales sin enzima y sin fluoróforo. Las placas fueron centrifugadas a 1,000 g y selladas con cinta adhesiva transparente antes de iniciar el ensayo, para evitar distorsiones debidas por ejemplo a la presencia de burbujas en la placa.

### 3.3 EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LOS FRAGMENTOS FVIIIa1, FVIIIa2, FVIIIa3 Y DE LAS VARIANTES DEL DOMINIO EXTRACELULAR DE PAR1

Las secuencias de los conectores interdominios del factor VIII de la coagulación y del dominio extracelular del receptor PAR1 humanos que fueron empleados en este trabajo junto a algunas características fisicoquímicas relevantes de los mismos se recogen en la Tabla 3.1. Los fragmentos FVIII (330-372), FVIII (712-740) y FVIII (1649-1689), en adelante llamados de forma simplificada FVIIIa1, FVIIIa2 y FVIIIa3, incluyen una cola de histidinas en el extremo N-terminal que facilita su purificación por cromatografía de afinidad, y un residuo de cisteína en el extremo C-terminal para modificaciones posteriores. Mientras que los fragmentos PAR1 (37-102) y PAR1 (42-102), en adelante llamados PAR1<sub>L</sub> y PAR1<sub>S</sub>, incluyen la cola de histidinas en el extremo C-terminal. Todos estos polipéptidos derivados de los sustratos de la trombina fueron obtenidos por expresión recombinante en *E. coli*, como se detalla más adelante.

| Fragmento                     | Secuencia de aminoácidos                                                     | P <sub>m</sub> (Da) | pI   | Abs <sup>280</sup><br>0,1% |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------------|------|----------------------------|
| FVIIIa1<br>(330-372)          | ASHHHHHHPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMD<br>VVRFDNNSPSFIQIRGSGC                   | 6402.7              | 4.51 | 0.233                      |
| FVIIIa2<br>(712-740)          | ASHHHHHHGGDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR<br>GSGC                               | 4726.9              | 5.75 | 1.261                      |
| FVIIIa3<br>(1649-1689)        | ASHHHHHHGEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDF<br>DIYDEENQSPRGSGC                    | 6284.5              | 4.54 | 0.474                      |
| PAR1 <sub>L</sub><br>(37-102) | TLDPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEEKNESGLTEYRLVSIN<br>KSSPLQKQLPAFISEDASGYLTSSWLTHHHHHH | 8476.3              | 5.78 | 1.825                      |
| PAR1 <sub>S</sub><br>(42-102) | SFLLRNPNDKYEPFWEDEEKNESGLTEYRLVSINKSSPL<br>QKQLPAFISEDASGYLTSSWLTHHHHHH      | 7893.6              | 5.78 | 1.960                      |

**Tabla 3.1 Secuencias y características fisicoquímicas básicas de los fragmentos derivados del factor VIII humano y del receptor PAR1 utilizados en el presente estudio.** Las secuencias de polihistidinas no naturales añadidas en el extremo N-terminal en FVIII y en el extremo C-terminal en PAR1 para facilitar la purificación se resaltan en cursiva. Se incluye el peso molecular (P<sub>m</sub>) expresado en daltons (Da), el punto isoeléctrico teórico (pI) y la absorbancia teórica para una solución de 1 g/l de la proteína pura a 280 nm (Abs 0.1%). Los parámetros han sido calculados utilizando las herramientas ProtParam del servidor de ExPASy ([www.expasy.org/tools](http://www.expasy.org/tools)) [Wilkins, Gasteiger, *et al.*, 1999] y mediante mMass 3.9.0 [Strohalm, Hassman, *et al.*, 2008].



### 3.3.1 Características esenciales de las cepas de *Escherichia coli* empleadas

---

Para la expresión recombinante de los fragmentos a1, a2 y a3 del factor VIII y de las dos variantes del dominio extracelular del receptor PAR1 humanos se utilizaron diferentes cepas competentes de *E. coli*, todas ellas One Shot® de Invitrogen: BL21(DE3), BL21(DE3) pLysS y BL21 Star™ (DE3) pLysS. Estas tres cepas son resistentes a la ampicilina. Además, las cepas BL21(DE3) pLysS y BL21 Star™ (DE3) pLysS contienen el marcador Cam<sup>R</sup>, que les confiere resistencia a cloranfenicol. Para mantener la viabilidad de las células, estas se almacenan a -70°C hasta el momento previo a su utilización.

La cepa BL21(DE3) se recomienda para los sistemas de expresión basados en el promotor del bacteriófago T7, que son inducibles por IPTG. Es portadora del lisógeno DE3, y adecuada para la sobre-expresión de proteínas no tóxicas para *E. coli*. La cepa BL21(DE3) pLysS deriva de la anterior; el plásmido pLysS codifica para la lisozima de T7, un inhibidor de la polimerasa de T7 que elimina casi completamente la expresión a nivel basal del gen de interés antes de la inducción. Por tanto, esta cepa es apropiada para la expresión heteróloga de proteínas tóxicas. Finalmente, la cepa BL21Star™ (DE3) pLysS se deriva también de la primera, y está especialmente diseñada para mejorar el rendimiento de sistemas de expresión de proteínas basados en el promotor del bacteriófago T7. Esta cepa contiene una mutación en el gen que codifica para la ARNasa E (rne131), que es una de las principales responsables de la degradación del ARNm. Por esta razón, la estabilidad de los transcritos de ARNm aumenta significativamente en las células BL21Star™ (DE3), favoreciendo así la expresión de los vectores bajo el promotor T7.

### 3.3.2 Plásmidos de expresión

---

Los plásmidos para la expresión de los dominios del FVIII y de PAR1 fueron preparados por la compañía Entelechon GmbH (Regensburg, Alemania; [www.entelechon.com](http://www.entelechon.com)). Los conectores interdominios FVIIIa1, FVIIIa2 y FVIIIa3, así como las variantes del dominio extracelular PAR1<sub>L</sub> y PAR1<sub>S</sub> (ver Tablas 3.1 y 3.2) fueron clonados en la región del promotor T7, entre los sitios de restricción *Nde*I y *Bam*HI del vector de clonación pET-3a (Anexo 4), el cual contiene el marcador *bla* (Ap) que confiere resistencia a la ampicilina.

| Fragmento         | Secuencia de nucleótidos que codifican para el fragmento deseado (5' – 3')                                                                                                                                                                                           |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FVIIIa1           | <u>catatg</u> <b>GCA</b> agccatcaccacatcatcaccggaagaaccacagctgcgtatgaaaaacaacgaggaagcggaa<br>gactacgatgatgacctgaccgactctgagatggacgtagttcgcttcgatgacgataactctccgtccttcacccagat<br>tcgtggatccggc <b>TGC</b> taa                                                        |
| FVIIIa2           | <u>catatg</u> <b>GCA</b> tctcaccatcaccatcaccatggtgacaaaaacaccggtgactactatgaggactcctacgaagacat<br>ctctgcttacctgctgagcaaaaacaacgcaattgaaccgcgtggatccggc <b>TGC</b> taa                                                                                                 |
| FVIIIa3           | <u>catatg</u> <b>GCT</b> tctcaccatcaccatcatcacggtgaaatcaccggtactactctgcagctctgaccaggaagaaatcgac<br>tatgatgacaccatcagcgttgagatgaaaaagaagacttcgacatctacgatgaggatgaaaaccagttccgcg<br>tggatccggc <b>TGC</b> taa                                                          |
| PAR1 <sub>L</sub> | <u>catatg</u> <b>ACT</b> ttggaccctagatccttttactgcgtaacccaaatgacaaatcgaaccgttctgggaggacgaaga<br>gaagaatgaaagcggctctgaccgaataccgactcgtgtcgataaacaagctctcccttacagaagcaacttccgg<br>cgtttattagcgaagatgctagtgttatctgacgagttcatggctgacacatcaccatcaccat <b>CAT</b> taaggatcc |
| PAR1 <sub>S</sub> | <u>catatg</u> <b>TCC</b> tttctgttgcgtaatcccaatgacaaatcagagccgttttgggaagatgaggagaaaaacgaatctgga<br>ctgacagagtataggctggtaagcattaacaaatcgagtcctcttcaaaagcagttaccggcggttatctccgaagatg<br>ccagcgggtatctcactagctcatggtaaccacatcatcaccat <b>CAT</b> taaggatcc               |

**Tabla 3.2 Secuencias de nucleótidos clonadas en los plásmidos de expresión para la producción recombinante de los fragmentos de interés descritos en la tabla 3.1.** En los extremos 5' y 3' de las secuencias presentadas se subraya la región de nucleótidos reconocidos por las endonucleasa *NdeI* y *BamHI*, respectivamente. En mayúsculas y negrita, se indican los tripletes correspondientes para el primer y último residuo de cada fragmento recombinante; y en letra itálica se resalta el codón de terminación. En el Anexo 4 se adjunta el mapa del vector pET-3a, en el que fueron clonados estos genes sintéticos.

### 3.3.3 Transformación de células competentes

En todos los casos la transformación de células competentes con los plásmidos de expresión se llevó a cabo mediante choque térmico siguiendo el siguiente protocolo:

1. Descongelar las células lentamente en un baño de hielo.
2. Añadir asepticamente 10 ng de ADN a las células y agitar suavemente. (En campana de esterilidad biológica o, en su defecto, en el entorno de una llama).
3. Incubar las células durante 30 minutos en hielo.
4. Seguidamente, incubar a 42 °C durante 45 segundos.
5. Colocar las bacterias nuevamente en el baño de hielo, durante al menos 2 minutos.
6. Añadir 250 µl de medio SOC (ver composición en la lista de reactivos en el Anexo 5), previamente calentado a 37 °C.
7. Incubar las células durante 1 hora a 37 °C con agitación constante a 225 rpm.
8. Centrifugar suavemente el vial de células durante 1 minuto a 3500 rpm, y resuspender mediante agitación suave el *pellet* en 50 µl de medio SOC.
9. Extender sobre una placa Petri con LB/agar y los antibióticos adecuados los 50 µl de la

reacción de transformación (ver Anexo 5), y dejar incubando toda la noche a 37 °C con las placas boca abajo.

A lo largo de esta investigación, en todos los medios se emplearon antibióticos a las concentraciones de 100 µg/ml de ampicilina (todas las cepas) y 34 µg/ml de cloranfenicol (adicionalmente, para las células BL21(DE3) pLysS y BL21 Star™ (DE3) pLysS).

### 3.3.4 Precultivos y obtención de glicerolados

El protocolo seguido para crecer los cultivos bacterianos con el objetivo de sobreexpresar las proteínas recombinantes de interés es el que se detalla a continuación:

1. Escoger una única colonia de la placa Petri de transformación con una punta estéril. Utilizar preferiblemente colonias frescas (menos de una semana desde la transformación).
2. Sumergir la punta asépticamente en 50 ml de medio LB conteniendo los antibióticos correspondientes.
3. Dejar crecer el cultivo durante la noche a 37 °C con agitación constante a 225 rpm.
4. Al día siguiente proceder con la preparación de glicerolados (paso 4.1) y/o la expresión de la proteína recombinante (epígrafe 3.3.5).
  - 4.1 La preparación de glicerolados de un cultivo bacteriano permite garantizar la disponibilidad de un respaldo (*stock*) de bacterias transformadas con los plásmidos de interés. Con este objetivo se toman alícuotas de 0.5 ml del precultivo, a las cuales se les añade el mismo volumen de 30% glicerol en LB, previamente autoclavado. Se mezcla suavemente el cultivo bacteriano con el glicerol añadido, y se introducen los viales rápidamente en nitrógeno líquido. Las alícuotas se almacenan a -80 °C hasta su uso posterior.
  - 4.2 Para preparar un precultivo a partir de las células congeladas, se deja descongelar un vial de glicerolado bacteriano a temperatura ambiente y se inocular su contenido en 50 ml de medio LB previamente autoclavado con el/los antibióticos correspondientes. Posteriormente se procede igual que con un precultivo crecido a partir de una colonia transformada.

### 3.3.5 Expresión a gran escala

Para cultivos de mayor volumen se procedió como sigue a partir de los precultivos obtenidos como se indica en el epígrafe anterior:

1. Inocular los 50 ml del precultivo en 2 litros de medio LB con los antibióticos correspondientes, en un matraz de 5 litros previamente autoclavado.

2. Incubar el cultivo bacteriano a 37 °C con agitación constante a 225 rpm hasta que la absorbancia a 600 nm ( $A_{600}$ ) se encuentre en el rango 0.4-0.8 (inicio de la fase exponencial de crecimiento). Como blanco para la medida de la  $A_{600}$  se emplea el propio medio LB.
3. Inducir la expresión de la proteína recombinante mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0.1-1.0 mM. Para la expresión de los dominios de interés, en este trabajo se utilizó una concentración intermedia de 0.55 mM.
4. Incubar a 37 °C durante 6 horas con agitación constante a 225 rpm, para permitir una correcta aireación del cultivo.
5. Centrifugar las células cultivadas a un máximo de 4500 g durante 20 minutos, y congelar el sedimento obtenido a -20 °C.

### **3.3.5.1 Expresión a gran escala en medio mínimo para el marcaje con $^{13}\text{C}$ y $^{15}\text{N}$ del fragmento recombinante FVIIIa1**

Para obtener el FVIIIa1 marcado para los ensayos de RMN (epígrafe 3.7), el fragmento recombinante se sobreexpresó en cepas de *E. coli* pLysS en medio mínimo M9 suplementado con cloruro de amonio- $^{15}\text{N}$ , como única fuente de nitrógeno y/o  $^{13}\text{C}$  D-glucosa, como única fuente de carbono (ver Anexo 5). En este caso, el precultivo se obtiene de la misma forma que para un precultivo en medio LB (epígrafe 3.3.4) y la expresión a gran escala como se indica a continuación:

1. Centrifugar los 50 ml de precultivo obtenido a 3000 g durante 20 minutos y a 4°C.
2. Resuspender el *pellet* de células en 20 ml de medio mínimo M9 (ver Anexo 5).
3. Inocular los 20 ml de células en 1 litro de medio mínimo M9 suplementado con cloruro de amonio- $^{15}\text{N}$  y/o  $^{13}\text{C}$  D-glucosa, y con los antibióticos correspondientes, en un matraz de 5 litros previamente autoclavado.
4. Incubar a 37 °C con agitación constante a 225 rpm hasta que la absorbancia a 600 nm se encuentre en el rango 0.6-0.8. Como blanco para la medida de la  $A_{600}$  se emplea el propio medio mínimo M9.
5. Inducir la expresión de la proteína recombinante mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0.55 mM IPTG.
6. Incubar a 37 °C durante 6 horas con agitación constante a 225 rpm, para permitir una correcta aireación del cultivo.
7. Centrifugar las células cultivadas a un máximo de 4500 g durante 20 minutos, y congelar el sedimento obtenido a -20 °C.

### 3.4 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

La mutagénesis dirigida es una técnica que permite generar cambios en una secuencia nucleotídica de doble cadena, en nuestro caso mutaciones puntuales en el ADNc que codifica para fragmentos de los sustratos de la trombina, FVIII y PAR1. El procedimiento empleado consiste esencialmente en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que emplea el vector plasmídico como ADN molde y dos oligonucleótidos cebadores sintéticos que contienen la mutación deseada aproximadamente en mitad de su secuencia. Mediante la reacción de PCR se amplifica una nueva hebra de plásmido que contiene la mutación deseada. Posteriormente se elimina el plásmido silvestre mediante la incubación con la endonucleasa *Dpn I*, la cual es específica para el ADN metilado. De esta forma, sólo los plásmidos sintetizados mediante PCR se conservan intactos, mientras que el plásmido de partida es degradado.

Los oligonucleótidos cebadores se diseñaron teniendo en cuenta que tanto el cebador 5' a 3' (*sense*) como el cebador 3' a 5' (*antisense*) han de codificar la misma mutación. La longitud de los cebadores ha de encontrarse entre las 25 y las 45 bases, ya que cebadores más pequeños podrían unirse de forma inespecífica al ADN, mientras que oligonucleótidos más largos podrían contener elementos de estructura secundaria que dificultarían la reacción de mutagénesis. Además, la temperatura de hibridación de los cebadores al ADN molde,  $T_{hybr}$ , ha de ser mayor o igual a 78 °C. La  $T_{hybr}$  se calcula según la fórmula:

$$T_{hybr} = 81.5 + 0.41 \times (\%GC) - 675/N - \% mismatch$$

donde  $N$  es el número de bases del cebador, %GC es un número entero que corresponde al porcentaje de guaninas y citosinas en el cebador, y que es aconsejable que sea igual o superior al 40%. El % *mismatch* es otro número entero que corresponde al número de bases del cebador que no se aparean con el ADN molde respecto al número total de bases del mismo. Atendiendo a estas restricciones, se diseñaron los cebadores cuyas secuencias se recogen en la tabla 3.3.

La síntesis de los cebadores (50 nmoles de cada uno, purificados mediante HPLC) fue solicitada a Invitrogen ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)). A partir del producto liofilizado recibido, se prepararon disoluciones madre de los cebadores a una concentración de 2 µg/µl en agua bidestilada, y a partir de éstas las disoluciones de trabajo (a 20 ng/µl).

| Mutación                  | Cebador | Secuencia                                                | T <sub>m</sub> (°C) |
|---------------------------|---------|----------------------------------------------------------|---------------------|
| FVIIIa1<br>R372Q          | 5'→3'   | cgtccttcatccagatt <b>CAG</b> ggatccggctgctaacaaag        | 81.2                |
|                           | 3'→5'   | gcaggaagtaggtctaa <b>GTC</b> cctagggcgcgacgattgtttc      |                     |
| FVIIIa1<br>G373P          | 5'→3'   | gtccttcatccagattca <b>GCC</b> atccggctgctaacaaag         | 79.0                |
|                           | 3'→5'   | caggaagtaggtctaagt <b>CGG</b> tagggcgcgacgattgtttc       |                     |
| FVIIIa3<br>R1689A         | 5'→3'   | gaaaaccagtctccg <b>CAG</b> ggatccggctgctaac              | 78.7                |
|                           | 3'→5'   | cttttggtcagaggg <b>GTC</b> cctagggcgcgacgattg            |                     |
| PAR1 <sub>L</sub><br>R42Q | 5'→3'   | gatatacatatgactttggaccct <b>CAA</b> tcctttctactgcgtaaccc | 79.4                |
|                           | 3'→5'   | ctatatgtatactgaaacctggga <b>GTT</b> aggaaagatgacgcattggg |                     |
| PAR1 <sub>L</sub><br>S43P | 5'→3'   | catatgactttggaccctcaa <b>CCC</b> tttctactgcgtaac         | 79.5                |
|                           | 3'→5'   | gtatactgaaacctgggagtt <b>GGG</b> aaagatgacgcattg         |                     |

**Tabla 3.3 Relación de cebadores diseñados para la mutagénesis dirigida del FVIIIa1, FVIIIa3 y PAR1<sub>L</sub>.**

La reacción de PCR se realizó siguiendo el procedimiento recomendado en el kit empleado, *QuikChange Lightning Site-directed Mutagenesis* (Agilent Technologies). Se realizaron dos reacciones para cada mutante, empleando 10 ng y 50 ng del ADN molde. A continuación se recoge el protocolo para la reacción realizada usando 50 ng del plásmido molde. En un tubo Eppendorf de 0.2 ml se mezclan:

5 µl de 10× tampón de reacción (kit)  
 5 µl (50 ng) del plásmido molde  
 6.25 µl (125 ng) del cebador *sense* (20 ng/µl)  
 6.25 µl (125 ng) del cebador *antisense* (20 ng/µl)  
 1 µl de la mezcla de nucleótidos  
 1.5 µl del reactivo *QuikSolution*  
 ddH<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 50 µl  
 A esta mezcla finalmente se le añade  
 1 µl de polimerasa de ADN *QuikChange Lightning-PfuUltra* HF (2.5 U/µl)

Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador MultiGene Mini (Labnet), con los siguientes parámetros:

| Segmento | Nº ciclos | T (°C) | Tiempo  |
|----------|-----------|--------|---------|
| 1        | 1         | 95     | 2 min   |
| 2        | 16        | 95     | 20 s    |
|          |           | 60     | 10 s    |
|          |           | 68     | 2.5 min |
| 3        | 1         | 68     | 5 min   |
| 4        | -         | 4      | ∞       |

Tras las reacciones de PCR, se procedió a eliminar el ADN molde añadiendo 2 µl de la enzima de restricción *Dpn I* (10 U/µl) directamente a cada tubo de reacción y, tras agitar suavemente se incubaron durante 5 min a 37 °C. Posteriormente, se transformaron células supercompetentes *XL10-Gold* (Agilent Technologies) siguiendo el protocolo indicado anteriormente (epígrafe 3.3.3). Las células transformadas se extendieron en condiciones asépticas sobre una placa de LB-agar conteniendo 100 µg/ml de ampicilina y 34 µg/ml de cloranfenicol.

### 3.4.1 Secuenciación del ADN

Para comprobar la secuencia del ADN mutado, se crecieron *overnight* cultivos a partir de colonias aisladas de las células *XL10-Gold* en 10 ml de LB-ampicilina-cloranfenicol. Se recogieron las bacterias por centrifugación a 3000 g y se extrajo el ADN utilizando el kit de purificación *Wizard® Plus SV Minipreps* de Promega, siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

La secuencia del ADN mutado se comprobó utilizando un cebador que se une al promotor T7 incluido en el plásmido de expresión (ver mapa del plásmido en el Anexo 4) en el servicio de secuenciación de ADN del CRAG-IRTA-CSIC, a cargo de la Dra. Mercè Miquel.

## 3.5. PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS RECOMBINANES DEL FVIII Y DE PAR1

### 3.5.1 Lisis celular

La extracción de las proteínas sobreexpresadas en *Escherichia coli* se realizó mediante lisis celular por congelación/descongelación o por medio de detergentes, siendo éste último el

procedimiento preferido. A continuación se describen los protocolos seguidos en cada caso (ajustados a 2 l de cultivo).

### **3.5.1.1 Lisis por congelación/descongelación**

1. Descongelar a temperatura ambiente el sedimento celular obtenido tras la expresión.
2. Resuspender el sedimento en 70 ml de tampón de lisis (ver composición de tampones en el Anexo 5) conteniendo 10  $\mu$ M PMSF. Una vez bien resuspendidas las células, añadir ADNasa I a una concentración final de 0.5  $\mu$ g/ml y  $MgCl_2$  a 20 mM.
3. Agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Romper las células con dos ciclos de congelación en un baño de  $N_2$  líquido y descongelación en un baño de agua a 37 °C con ultrasonicación durante 25 segundos a un 50% de la potencia total y empleando una punta plana.

### **3.5.1.2 Lisis química con detergentes**

1. Resuspender las células congeladas en 50 ml de B-PER (Thermo Scientific) con 1 mM PMSF. Una vez bien resuspendidas, añadir ADNasa I a una concentración final de 0.5  $\mu$ g/ml,  $MgCl_2$  a 20 mM y 1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol.
2. Agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
3. Centrifugar a 13000 g durante 20 minutos a 4 °C.

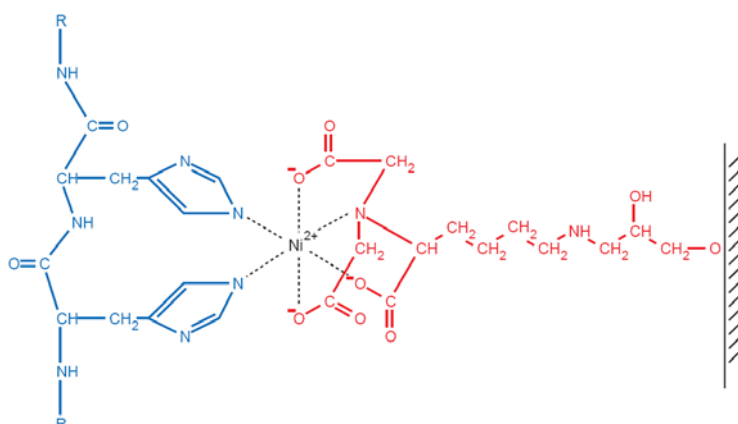
Tomar muestras tanto del sobrenadante como del sedimento para su posterior análisis por electroforesis. Los fragmentos FVIIIa1, FVIIIa3 y una proporción de PAR1<sub>L</sub> humano sobreexpresados de forma heteróloga en este trabajo se obtuvieron de forma soluble, y se extraen principalmente en el sobrenadante, que se recoge para la subsiguiente purificación de las proteínas recombinantes, mientras que el sedimento se desecha. Los fragmentos FVIIIa2, PAR1<sub>L</sub> y PAR1<sub>S</sub> requirieron pasos adicionales de extracción con 2 o 4 M de urea a partir del sedimento debido a su poca solubilidad en B-PER.

### **3.5.2 Purificación por cromatografía de afinidad**

La purificación de los fragmentos recombinantes del FVIII y de PAR1 se realizó directamente de los sobrenadantes extraídos en el paso anterior utilizando resinas cromatográficas. Este paso de purificación se basa en la interacción del ión  $Ni^{2+}$  unido a una matriz específica con las colas de seis histidinas consecutivas situadas en los extremos



terminales de las proteínas recombinantes (ver Figura 3.2). La purificación de estos dominios del factor VIII y PAR1 humano obtenidos de forma recombinante se realizó tanto en *batch* como utilizando un equipo de FPLC, como se describe a continuación.



**Figura 3.2 Representación esquemática de las interacciones en las que se basa la cromatografía de afinidad por cationes  $\text{Ni}^{2+}$ .** El ácido nitrilotriacético (NTA) es un agente quelante que ocupa cuatro de las seis posiciones de coordinación del ión  $\text{Ni}^{2+}$ , dejando dos sitios libres de unión que coordinan al N-3 de dos histidinas adyacentes de la cola de 6 histidinas del extremo terminal de los fragmentos recombinantes. Figura extraída del manual *The QIAexpressionist*, 5ª Edición, Junio 2006, de QIAGEN.

### 3.5.2.1 Purificación en *batch* utilizando resina de afinidad Ni-NTA agarosa

La purificación en *batch*, que se realiza incubando la resina de afinidad con la disolución de proteínas que se pretende purificar, es un procedimiento rápido y efectivo. El protocolo empleado en nuestro caso consta de los siguientes pasos:

1. Añadir al sobrenadante resultante de la extracción de proteínas de *E. coli* (epígrafe 3.5.1) la matriz de Ni-NTA acoplado a agarosa (Qiagen), previamente equilibrada en el tampón de equilibrado (ver relación de tampones utilizados, Anexo 5). Se emplea una proporción de 1 ml de resina por 50 ml de sobrenadante del extracto celular que contiene la proteína heteróloga, correspondiente a 2 l de cultivo bacteriano. La resina se incuba a 4 °C durante 3-4 horas con agitación suave y constante en un agitador orbital.
2. A continuación, transvasar la suspensión de resina en una columna vacía provista de un filtro en el extremo inferior, y recoger la fracción excluida. Esta fracción contiene las proteínas que no se han unido a la resina, y por tanto se denomina también fracción *NB*, del inglés *non-bound*).
3. Lavar la resina depositada sobre el filtro con 5 volúmenes de tampón de equilibrado, y recoger la fracción saliente (fracción de lavado).
4. Finalmente, eluir el material unido de forma específica a la resina mediante el lavado de la misma con tampón de elución (ver tabla de tampones) que contiene cantidades crecientes de imidazol (hasta 500 mM).

Se toman muestras de cada uno de los pasos para su evaluación posterior por electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot (epígrafe 3.6.3).

### 3.5.2.2 Purificación mediante cromatografía FPLC de afinidad

Como alternativa a la purificación en *batch*, y con el objetivo de lograr una mayor pureza de las proteínas recombinantes, también se utilizó un sistema de FPLC (del inglés: *fast-performance liquid chromatography*) para la purificación por afinidad del conector FVIIIa1 y sus mutantes puntuales. En este caso, la resina de afinidad Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) se encuentra empaquetada en columnas HisTrap™ FF (GE Healthcare) de 1 ó 5 ml. La cromatografía se realizó empleando un cromatógrafo Äkta Explorer (GE) siguiendo el protocolo que se detalla a continuación.

1. Centrifugar durante 20 minutos el sobrenadante de la extracción a 15000 g (aproximadamente 50 ml), y dializar a 4 °C frente a 4 litros de tampón de equilibrado en presencia del inhibidor de proteasa PSMF (10 µM). Realizar tres cambios de tampón en un periodo de 24 horas.
2. Centrifugar el sobrenadante dializado a 13000 g durante 30 minutos a 4 °C, para eliminar proteínas que puedan haberse desnaturalizado y precipitado.
3. Cargar la muestra clarificada en el paso anterior en la columna de cromatografía, previamente equilibrada con el tampón de equilibrado, utilizando para ello un *superloop* de 50 ml. El *superloop* facilita el manejo de grandes volúmenes de muestra y permite la automatización de este paso, de manera que a partir de este punto se puede programar la purificación, empleando el programa Unicorn (GE Healthcare).
4. Una vez cargada la muestra, pasar al menos 5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado para eliminar las proteínas que se hayan quedado adheridas a la resina inespecíficamente.
5. Aplicar posteriormente un gradiente de 0 a 70% de tampón de elución (ver Anexo 5). La cromatografía se supervisa registrando la absorbancia a 280 y 256 nm. Si el equipo se encuentra acoplado a un colector automático de fracciones como el Frac-950 (GE), las diferentes fracciones se recolectan automáticamente. Si no es así, se pueden recoger las proteínas eluidas manualmente de manera directa de la salida del cromatógrafo.

Como en el caso de la purificación en *batch*, se toman muestras de cada una de las fracciones (*non-bound*, lavados y fracciones de elución) para ser analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

### 3.6 ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS PURIFICADAS

#### 3.6.1 Digestión enzimática y análisis por espectrometría de masas

La autenticidad y pureza de los fragmentos recombinantes del FVIII y del PAR1 humano purificados como se describe más arriba, se comprobaron mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF) con dos estrategias de confirmación. En la primera se evaluaron las masas de cada uno de los fragmentos recombinantes sin digerir, y en la segunda estrategia, para análisis más detallados, se incubaron 20 µg de cada fragmento recombinante del FVIII con 0.4 µg de tripsina ó 0.67 µg de Asp-N en un volumen final de 50 µl, a 37 °C por 8 horas en el tampón de digestión indicado por el fabricante (ver Anexo 5). En el caso del PAR1, se digirieron 20 µg de cada variante sobreexpresada con 0.4 µg de Glu-C, a 25 °C por 8 horas, en un volumen final de 50 µl en el tampón respectivo (Anexo 5). Las reacciones catalizadas por las proteinasas serínicas tripsina y Glu-C, se detuvieron con una concentración final de 1 mM de PMSF, mientras que las digestiones con la endoproteinasa Asp-N, una metaloproteasa que hidroliza los enlaces Xxx-Asp/Cys, se detuvieron con 20 mM EDTA.

Tanto los fragmentos recombinantes del FVIII y de PAR1 sin digerir, como los péptidos obtenidos tras las digestiones correspondientes se analizaron mediante espectrometría de masas utilizando un espectrómetro Autoflex II. Se mezclaron 2 µl de la muestra a analizar sobre una matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) a 0.3 mg/ml en etanol:acetona (2:1) para péptidos pequeños, o de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) a 50 mM en acetona:ACN:H<sub>2</sub>O (1:1:1) para péptidos de un peso molecular superior a 3000 Da en un tubo *Eppendorf*. La mezcla se aplicó sobre una placa MALDI (AnchorChip 384, Bruker) y se dejó evaporar para conseguir su cristalización, antes de ser introducida en el espectrómetro. Los espectros se procesaron con FlexControl y FlexAnalysis 2.0 (Bruker GmbH, Bremen, Alemania).

#### 3.6.2 Determinación de la concentración de proteínas

Las proteínas absorben la luz ultravioleta con máximos alrededor de 200 y 280 nm. Los enlaces peptídicos son los principales responsables del pico de absorción a 200 nm, y los aminoácidos con anillos aromáticos son los que contribuyen esencialmente al segundo máximo de absorbancia [Pace, Vajdos, *et al.*, 1995]. La determinación de la concentración de proteínas a partir de su absorbancia a 280 nm es un método rápido (no es necesario preparar patrones de

proteína ni curvas estándar), y adecuado cuando se dispone de disoluciones de proteína de elevada pureza, como son en nuestro caso las proteínas recombinantes purificadas por cromatografía de afinidad. La relación entre la absorbancia y la concentración de proteína es lineal en un amplio rango de concentraciones, y se determina mediante la ley de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon c l$$

donde  $A$  es la absorbancia a una determinada longitud de onda,  $\varepsilon$  es el coeficiente de absorción molar, expresado en  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , y  $l$  es el paso de luz (longitud que recorre la luz a través del material absorbente), expresado en cm. Las concentraciones de las proteínas empleadas en el presente estudio se determinaron generalmente a partir de la absorbancia de sus disoluciones acuosas a 280 nm.

La absorbancia se midió empleando un espectrofotómetro UV-Vis Cary 100 Bio (Varian), de doble haz, en microcubetas de 100  $\mu\text{l}$  de cuarzo (Hellma) con un paso de luz de 1 cm, o bien un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). En la cubeta de referencia se coloca el blanco, que corresponde al tampón en el que se encuentra la proteína, y en la de medida se coloca la proteína a una dilución apropiada. Con el valor de absorbancia obtenido a 280 nm, se calcula la concentración teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar conocido (por ejemplo, en el caso de la trombina,  $6.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ó  $\varepsilon_{1\text{cm}, 280\text{nm}}^{1\%} = 18.3$ , según las indicaciones del proveedor). En el caso de los fragmentos recombinantes generados en este trabajo, se utilizó el coeficiente de extinción molar teórico calculado según la herramienta ProtParam de Expasy (<http://web.expasy.org/protparam/>) [Gasteiger, Gattiker, *et al.*, 2003].

Si bien la concentración deseada se puede calcular directamente a partir del valor de  $A_{280 \text{ nm}}$  (o una longitud de onda cercana), es aconsejable registrar un espectro UV (por ejemplo, entre 200 nm y 310 nm), para verificar que el mismo corresponde al de una proteína bien plegada, y excluir por ejemplo distorsiones debidas a la presencia de sustancias que absorben a longitudes de onda cercanas (por ejemplo, ADN o ARN, que tienen máximos de absorbancia a 260 nm).

### 3.6.3 Electroforesis de proteínas

#### 3.6.3.1 Electroforesis en geles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), permite separar las proteínas de acuerdo con su movilidad electroforética (la cual es función del tamaño de las mismas) dentro de un gel compuesto por un entramado de acrilamida y bisacrilamida polimerizada, y es la técnica más usada para verificar la pureza de las proteínas recombinantes producidas.

Para resolver proteínas de un peso molecular relativamente bajo, como son los fragmentos del FVIII y de PAR1, se utilizaron geles de 12-15% (p/v) de poliacrilamida en un tampón Tris-tricina, especialmente indicados para la resolución de proteínas de peso molecular inferior a 30 kDa [Schagger, 2006, Schägger, 1987]. Estos geles se componen de dos fases, en la parte superior se encuentra el gel apilador, que incluye los pocillos de aplicación de las muestras, y que permite concentrar las proteínas antes de alcanzar al gel separador. En la parte inferior se sitúa un gel separador, de unos 5 cm de longitud, y el cual permite la separación de los péptidos por su tamaño. La composición de los geles se recoge en el Anexo 5.

Las proteínas analizadas por SDS-PAGE son previamente desnaturalizadas y cargadas de forma homogénea, de manera que migran a través del gel únicamente en función de su tamaño. Para ello, las muestras se tratan con el tampón de muestra, que contiene un 2% (p/v) del detergente iónico, SDS (ver lista de tampones), y se calientan a 95 °C durante 10 minutos en un bloque térmico, de manera que se asegure la completa desnaturalización de todas las proteínas. El tampón de muestra incluye además el colorante azul de bromofenol, lo que permite seguir el frente de avance de la electroforesis. El tampón de muestra puede incluir o no, según se desea, un agente reductor, comúnmente 2% (p/v) de DTT o 2-5% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol, con objeto de reducir los puentes disulfuro de las proteínas.

Los geles se montan en el sistema de electroforesis *Mini Protean 3* (BioRad), y se realiza la electroforesis utilizando los tampones correspondientes (ver tabla de tampones; notar que para el sistema de Tris-tricina los tampones del ánodo y el cátodo son diferentes). Normalmente se cargan entre 1 y 10  $\mu$ g de proteína por cada carril, con los volúmenes de muestra ajustados al mismo valor, usualmente 30  $\mu$ l. En uno de los pocillos se aplican 7  $\mu$ l de un

patrón estándar de peso molecular *Novex Sharp* (Invitrogen) para facilitar la identificación de las proteínas analizadas. Una vez cargadas todas las muestras se cierra el sistema y se aplica un potencial inicial de 80 V hasta que el frente de electroforesis pasa al gel separador; a partir de ese momento se puede aumentar el voltaje a 100-120 V. El tiempo de electroforesis es generalmente de 2 horas.

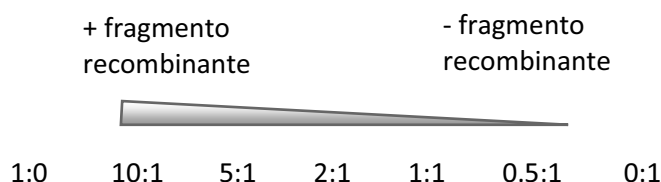
### **3.6.3.2 Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida y experimentos de desplazamiento de banda (*band shift*)**

La electroforesis en geles de poliacrilamida que no contienen ni detergentes iónicos desnaturalizantes como el SDS ni agentes reductores (DTT,  $\beta$ -mercaptoetanol) se emplearon en este trabajo para estudiar la formación de complejos de la trombina con los fragmentos del FVIII y de PAR1. Se utilizaron dos sistemas principalmente, dependiendo del pH de trabajo deseado. El primero, y más comúnmente usado, reproduce básicamente el sistema de Tris-glicina de Laemmli [Laemmli, 1970], (pH del gel separador: 8.5), pero excluyendo lógicamente el SDS y los agentes reductores de todas las soluciones. De forma alternativa, se utilizó el sistema HEPES/imidazol [McLellan, 1982], el cual permite estudiar las interacciones a un pH más fisiológico (7.4). En ambos casos, el porcentaje de acrilamida en los geles es menor [10% (p/v)], para facilitar la migración de las proteínas a través del enrejado del gel. (Esta migración ocurre mucho más lentamente que en condiciones desnaturalizantes, ya que las proteínas migran en función de su carga intrínseca a un pH dado y de su radio hidrodinámico. Por esta razón, la duración de la electroforesis es de unas 4-6 horas). Se utilizaron tanto geles con fase apiladora y separadora como geles únicamente separadores. La composición de los geles empleados se recoge en el Anexo 5.

Para la preparación de la muestra, en este caso se añade únicamente un tampón de muestra que contiene azul de bromofenol, para seguir el frente de la electroforesis, y con un 10% (v/v) glicerol, que facilita el asentamiento de las proteínas en el fondo del pocillo. Es importante recordar que las muestras no se calientan, ya que esto provocaría la desnaturalización de las proteínas. El montaje es el mismo que en el caso de SDS-PAGE, pero en este caso se emplea el mismo tampón tanto para el ánodo como para el cátodo (ver Anexo 5).

Para los ensayos de *band shift* se añadió una cantidad fija de trombina humana (normalmente, 5  $\mu$ g) a cantidades variables de los fragmentos recombinantes del FVIII y del

PAR1. Alícuotas de trombina y de estos fragmentos solos se aplicaron en los pocillos situados en los extremos del gel para comparar posteriormente la variación en las distancias migradas por las proteínas respectivas. En los pocillos intermedios, la relación molar entre trombina y péptido varió según se indica:



Los distintos complejos se prepararon en el tampón Tris-glicina (pH 8.0) ó HEPES/NaCl (pH 7.4) (ver Anexo 5), en presencia de 1.5 mM de  $\text{CaCl}_2$  y en un volumen final de 30  $\mu\text{l}$  por reacción. Los complejos se incubaron a 25 °C durante 20-30 minutos y se cargaron en un gel de poliacrilamida nativo, como se indica en el apartado anterior. Al inicio, para favorecer la entrada de las muestras en el gel, se aplicó una diferencia de potencial de 80 V, que luego se elevó a 120-140 V.

### 3.6.3.3 Tinción de los geles

Las bandas correspondientes a las proteínas se pueden visualizar directamente en el gel mediante tinción con azul de Coomassie o con plata. La tinción con azul de Coomassie permite detectar teóricamente cantidades mínimas de unos 50-100 ng de proteína [Merril, 1998]. En esta técnica, el gel se tiñe en agitación constante durante 20 minutos con la disolución de tinción (ver tabla de disoluciones del Anexo 5) a temperatura ambiente. Seguidamente se elimina la disolución de tinción y se destiñe en dos pasos, utilizando primero la disolución de desteñido I (Anexo 5) durante 1 hora y agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente, se transfiere el gel a la solución de desteñido II, con agitación continua, hasta que sólo queden visibles las bandas de proteína sobre un fondo transparente.

La tinción con plata es hasta 100 veces más sensible que la anterior [Switzer, Merrill, *et al.*, 1979], aunque el procedimiento es considerablemente más laborioso y comprende los siguientes pasos:

1. Fijar las proteínas en el gel incubándolo en la disolución de fijación durante al menos 10 min.
2. Lavar el gel durante 20 minutos con 40% (v/v) de etanol, para eliminar el ácido acético

presente en la solución de fijación, y evitar así que se forme acetato de plata.

3. Lavar el gel durante 20 minutos con agua bidestilada.
4. Incubar el gel en una disolución al 0.5% (p/v) de tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) durante 1 minuto para aumentar la sensibilidad y el contraste de la tinción.
5. Eliminar la disolución sensibilizadora y lavar durante 1 minuto dos veces con agua bidestilada.
6. Incubar durante 20 min el gel en una disolución de nitrato de plata al 2.5%. Los iones de plata tienen alta afinidad por los grupos sulfidrilos (-SH) de las cisteínas presentes en las proteínas.
7. Eliminar la disolución de tinción y lavar durante 1 minuto con agua bidestilada.
8. Revelar el gel con la disolución de revelado, dejando incubar en agitación durante 4-15 minutos hasta que aparezcan las bandas correspondientes a las proteínas, por reducción de los iones  $\text{Ag}^+$  a plata metálica.
9. La reacción de reducción se detiene colocando el gel en la disolución fijadora.

### 3.6.4 Inmunodetección de proteínas (*Western blotting*)

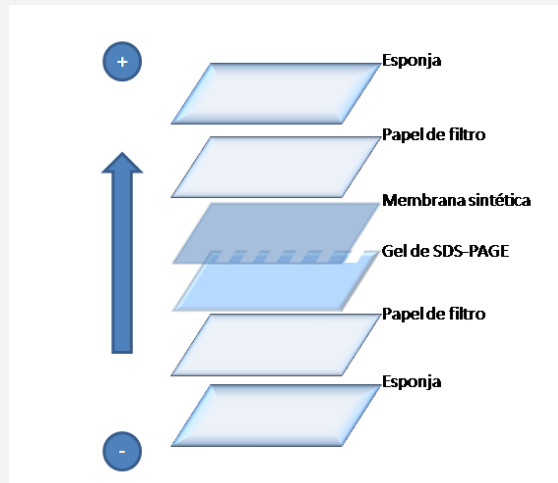
Esta técnica permite la detección de proteínas inmovilizadas sobre una membrana sintética empleando un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína estudiada (anticuerpo primario). A continuación, se incuba la membrana con un anticuerpo dirigido contra este (anticuerpo secundario), y que esté acoplado a su vez a la enzima HRP (peroxidasa de rábano). La HRP es capaz de oxidar sustratos cromogénicos, provocando una reacción quimioluminiscente gracias a la cual se detectan los complejos antígeno-anticuerpo sobre la membrana, y con ello la(s) banda(s) correspondiente(s) a la proteína que presenta el antígeno específico. En nuestro caso, la técnica se empleó para seguir el curso de las purificaciones de los fragmentos recombinantes de FVIII y PAR1; el antígeno detectado es la cola de seis histidinas consecutivas que presentan estos fragmentos en sus extremos N- o C-terminales, respectivamente (ver epígrafe 3.3). Como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-His (GE Healthcare), y como anticuerpo secundario el anticuerpo policlonal anti-conejo acoplado a HRP (Dako).

El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Las proteínas se separan por SDS-PAGE, como se describe en el epígrafe 3.6.3.
2. Seguidamente, las proteínas se transfieren a una membrana sintética de nitrocelulosa o PVDF, empleando el sistema *Mini Trans-blot cell* (BioRad). Para ello se prepara un "sandwich" en el que el gel de poliacrilamida que contiene las proteínas está en contacto con la membrana (ver



Figura 3.3). En una cubeta llena con el tampón de transferencia (ver Anexo 5) y provista de un cátodo y un ánodo planos, se sumerge el "sandwich" orientando la membrana hacia el ánodo. De este modo las proteínas migran hacia la membrana al aplicar una diferencia de potencial, y quedan retenidas en la misma. Usualmente, la transferencia se realiza a una intensidad de corriente constante de 400 mA y a 4 °C con agitación constante del tampón de transferencia, para evitar el sobrecalentamiento del sistema.



**Figura 3.3 Esquema del montaje en "sandwich" para la transferencia de proteínas a una membrana sintética.** El gel de poliacrilamida que contiene las proteínas separadas por SDS-PAGE se coloca en contacto con la membrana de nitrocelulosa o de PVDF, la cual se sitúa del lado del ánodo. La membrana y el gel se colocan entre dos papeles de filtro, y estos a su vez entre dos esponjas. Esto, además de ofrecer sujeción, permite la hidratación continua y homogénea del conjunto. Todo el sistema se encuentra inmerso en una cubeta con tampón de transferencia. Al aplicar la diferencia de potencial las proteínas, cargadas negativamente por el SDS unido, migran hacia el ánodo, quedando retenidas en la membrana.

3. La elección de la membrana (nitrocelulosa/PVDF) depende de la proteína estudiada y del anticuerpo utilizado. Generalmente las membranas de PVDF son preferibles para el análisis por WB de proteínas pequeñas o muy cargadas. Por esta razón, en nuestras investigaciones con los fragmentos del FVIII y de PAR1 se escogió este tipo de membrana, aunque sobre nitrocelulosa también se obtuvieron buenos resultados (Nota: la membrana de PVDF necesita humedecerse brevemente con metanol antes de ser utilizada, para ser activada).
4. Se bloquea la membrana con una disolución de 5% (p/v) de leche descremada en polvo en TBS (ver lista de tampones, Anexo 5) durante 1 h a temperatura ambiente, o durante toda la noche a 4 °C con agitación continua. De esta manera se evitan interacciones inespecíficas del anticuerpo primario con la membrana.
5. Tras el bloqueo, la membrana se incuba con el anticuerpo primario, en nuestro caso el anticuerpo monoclonal anti-His, dirigido contra la cola de histidinas, diluido 1:3000 en la disolución de bloqueo. Se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación continua.

6. Se lava la membrana seis veces durante 5 minutos con TBS, y se incuba con el anticuerpo secundario durante 1 hora, con agitación continua y a temperatura ambiente. En nuestro caso, se empleó como anticuerpo secundario el policlonal anti-conejo conjugado a HRP (Dako), a una dilución de 1:10000 en la disolución de bloqueo.
7. Para finalizar, se realizan otros seis lavados de 5 minutos con TBS antes de revelar la membrana.

Las bandas de proteína a las que se ha unido los anticuerpos se revelan mediante una reacción quimioluminiscente de oxidación de luminol (*Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* de Millipore) catalizada por la HRP acoplada al anticuerpo secundario. La reacción se lleva a cabo en la membrana, la cual se coloca en condiciones de oscuridad en el Kodak Image Station 4000MM PRO, para la detección de la reacción quimioluminiscente.

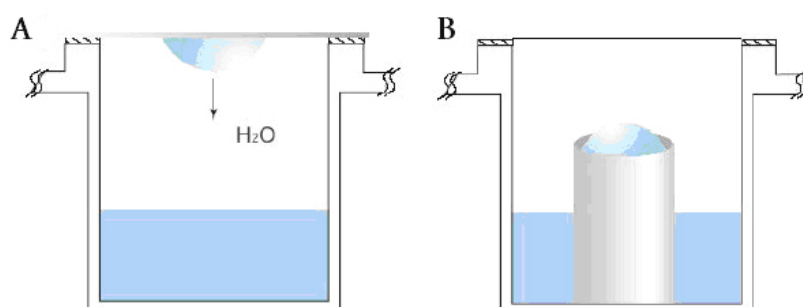
### 3.7 CRISTALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES

#### 3.7.1 Preparación de complejos para la cristalización

Los diferentes conectores del FVIII (FVIIIa1, FVIIIa2 y FVIIIa3, y los mutantes FVIIIa1(R372Q), FVIIIa1(R372Q, G373P) y FVIIIa3 (R1689Q), así como los dominios extracelulares de PAR1<sub>L</sub> y sus mutantes, PAR1<sub>L</sub> (R42Q) y PAR1<sub>L</sub> (R42Q, S43P) fueron expresados heterológamente y purificados como se describe más arriba (ver epígrafes del 3.3 al 3.5). Estas proteínas recombinantes se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con muestras de trombina o trombina-FPR humana previamente dializadas contra el tampón HEPES/NaCl pH 6.0 para eliminar el glicerol en el que vienen distribuidas (ver epígrafe 3.1). Todos los complejos se prepararon con un exceso molar del fragmento recombinante del sustrato de entre 2:1 y 15:1 en este tampón. A continuación los complejos (generalmente en un volumen final de 1 ml) fueron transferidos a un dispositivo Amicon Ultra-15 (Millipore), con una membrana de tamaño de poro nominal de 3 kDa, que permite concentrar la proteasa en presencia del fragmento de interés (Figura 3.1). Cuando la concentración alcanzada con los dispositivos Amicon Ultra-15 no era suficiente para realizar los ensayos de cristalización, se emplearon los dispositivos Microcon (Millipore), que permiten concentrar las muestras hasta volúmenes de alrededor de 10 µl.

### 3.7.2 Búsqueda de condiciones de cristalización y crecimiento de los cristales

La obtención y el crecimiento de los cristales se llevó a cabo mediante la técnica de difusión de vapor utilizando tanto la modalidad de gota colgante (*hanging drop*) como la de gota sentada (*sitting drop*) (ver Figura 3.4). Para los ensayos de gota colgante se utilizaron las placas ComboPlates™ de 24 pocillos (Greiner), con vidrios siliconizados de 18 mm para cubrir cada pocillo, y grasa de silicona (Bayer) para sellar el sistema de cristalización. Para las gotas sentadas se utilizaron las placas de cristalización de 24 pocillos *Linbro Plate* (Hampton Research); en este caso el sistema se sella con cinta adhesiva *Crystal Clear* de la misma firma.



**Figura 3.4 Modalidades de cristalización por difusión de vapor.** **A.** Gota colgante. La gota con una mezcla de disolución de proteína y de precipitante se deposita sobre un cubreobjetos siliconizado, que posteriormente se sella encima del reservorio que contiene la disolución de cristalización. **B.** Gota sentada. La gota se coloca en un pequeño reservorio cóncavo situado en un pedestal en el centro de un pocillo que contiene la disolución de cristalización. El sistema se cierra herméticamente con una cinta adhesiva ópticamente transparente. Los volúmenes de la gota pueden variar de 2 a 6  $\mu\text{l}$ , con diferentes relaciones entre el volumen de la disolución de proteína y el de la disolución de cristalización.

La búsqueda de condiciones de cristalización se comenzó utilizando los siguientes kits de cristalización: *Crystal Screen* (Hampton Research), *Structure Screen 1*, *Structure Screen 2*, *Morpheus™*, *Pro-Plex™* y *MIDAS™* (Molecular Dimensions), así como un kit de cristalización confeccionado en nuestro laboratorio, el *Thrombin Screen*, que incluye condiciones de cristalización previamente reportadas para la trombina y sus complejos (Anexo 6). Las disoluciones de proteína fueron centrifugadas a 13000 g durante 2-5 minutos para eliminar las partículas en suspensión, antes de proceder a realizar los ensayos de cristalización propiamente dichos.

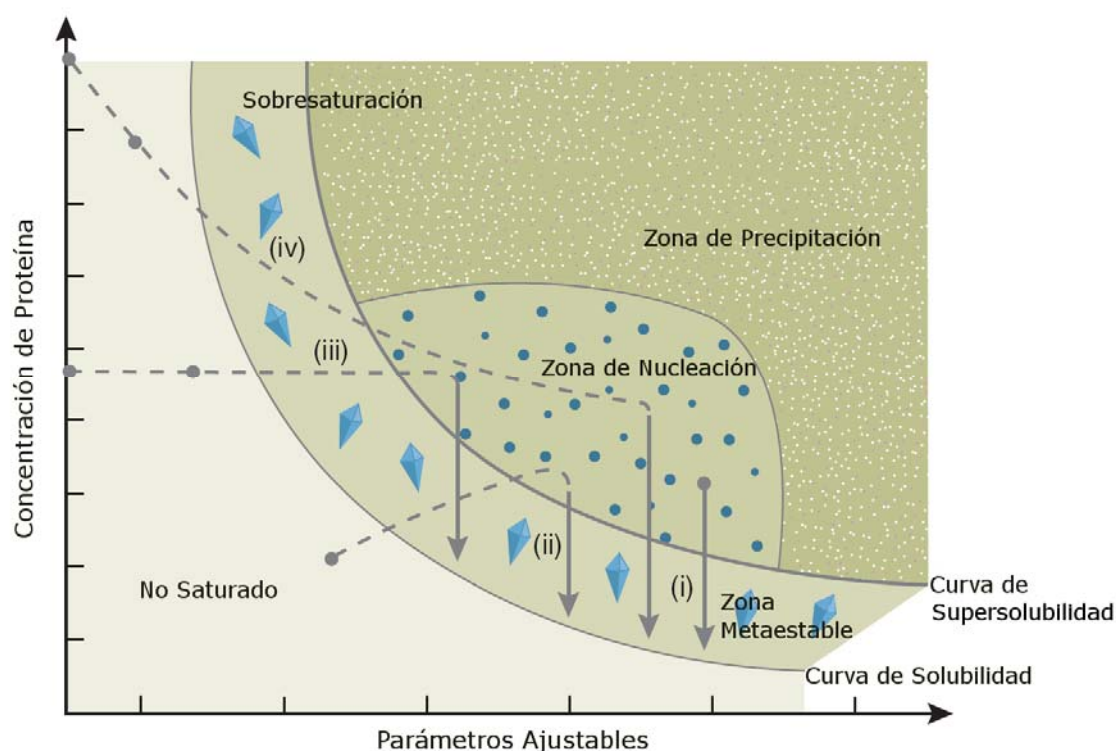
Independientemente del sistema utilizado, para iniciar cada ensayo de cristalización se mezcló una gota de la disolución concentrada de proteína (de 1 a 3  $\mu\text{l}$ ) con otra de similar volumen de la solución de cristalización. La proporción entre los volúmenes de ambas gotas es una de las variables que se modifica en los ensayos de cristalización; en los rastreos iniciales usualmente empleamos 1  $\mu\text{l}$  de ambas soluciones para un volumen final de la gota de 2  $\mu\text{l}$ . En

todos los casos, esta gota se deja equilibrar a través de la fase de vapor con un reservorio que contiene entre 0.5 y 1 ml de la disolución de cristalización, a una temperatura constante de 20 °C en una incubadora Rumed 3201 (Rumed). Las gotas fueron periódicamente inspeccionadas con una lupa Nikon SMZ800, equipada con una cámara para recoger fotografías de las mismas.

### **3.7.2.1 Técnicas de mejora de cristales**

La cristalización es un fenómeno de transición de fase que se puede ilustrar mediante un diagrama de fase que muestra en qué estado -soluble, cristalino o sólido amorfo (precipitado)- se encuentra la proteína estudiada en función de diferentes parámetros químico-físicos (Figura 3.6). Se pueden obtener experimentalmente proyecciones del diagrama de fases de la proteína estudiada variando dos parámetros al mismo tiempo. En un diagrama de fases típico se pueden distinguir cuatro áreas: un área de elevada supersaturación, donde la proteína precipita de forma amorfa y tiene lugar la formación de núcleos de forma espontánea; un área de menor supersaturación justo “debajo” de la zona de nucleación, en la que los cristales son estables y pueden crecer, pero no se producirá nueva nucleación. (Esta zona se conoce como zona metaestable, y generalmente contiene las mejores condiciones para el crecimiento de cristales grandes y ordenados). Finalmente, encontramos el área no saturada, donde la proteína es completamente soluble y nunca cristalizaría espontáneamente. Así, en términos prácticos, la cristalización se puede considerar como un proceso que ocurre en dos fases: la nucleación y el crecimiento de los cristales propiamente dicho; ambas fases precisan de diferentes condiciones. Tras la formación de un núcleo crítico, el crecimiento le sigue espontáneamente [Chayen, 2005, Chayen and Saridakis, 2008].

Los diagramas de fases de la solubilidad de una proteína en función de diferentes parámetros químico-físicos, se pueden utilizar para el diseño de experimentos de cristalización. Como se puede apreciar en la Figura 3.5, las “trayectorias” seguidas en el diagrama de fases en los cuatro métodos más comunes de cristalización (difusión de vapor, diálisis, difusión libre en la interfase y métodos microfluídicos) son bien diferentes. En particular, en el método de difusión de vapor (ii), la disolución de proteína se encuentra inicialmente en un estado no saturado, y gradualmente alcanza la sobresaturación al equilibrarse con una disolución que contiene una concentración más elevada del agente precipitante.



**Figura 3.5 Ilustración esquemática del diagrama de solubilidad de una proteína.** Los parámetros ajustables pueden ser la concentración del agente precipitante o de aditivos, el pH o la temperatura. Entre paréntesis se indican las “trayectorias” dentro del diagrama de fases que se siguen en los cuatro métodos principales de cristalización: (i) *microbatch*, (ii) difusión de vapor, (iii) diálisis y (iv) difusión libre. Cada método es caracterizado por una trayectoria diferente a través de las zonas de nucleación y metaestable, en este caso hipotético asumiendo la concentración de precipitante como el parámetro variable. Los círculos rellenos indican el punto de partida. En los métodos (iii) y (iv) se indican dos puntos de partida diferentes, que corresponden a ensayos iniciados con la proteína sola o con la proteína mezclada con una pequeña cantidad de precipitante. La curva de solubilidad está definida por la relación de equilibrio entre el estado sólido (cristal) y el estado líquido (la proteína disuelta). La curva de supersolubilidad se define como la línea que separa las condiciones bajo las que ocurre la nucleación espontánea (separación de fases o precipitación) de aquellas en las que la disolución de cristalización permanece clara. Figura adaptada de [Chayen and Saridakis, 2008].

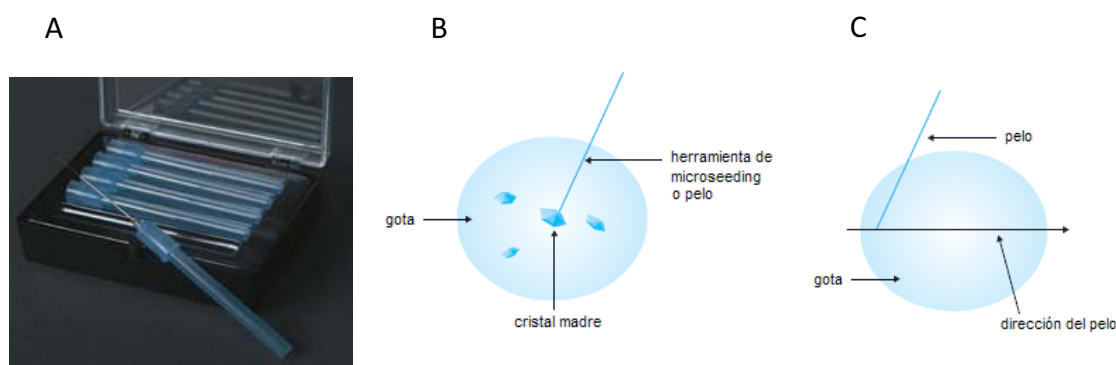
### 3.7.2.1.1 Técnicas previas al crecimiento

En un ensayo de cristalización, debido a una difusión rápida en el sistema de cristalización, puede ocurrir que se produzca una nucleación excesiva, es decir, la formación de numerosos cristales pequeños y de baja calidad cristalográfica, o bien que el sistema se encuentre lejos de la zona de nucleación y no se llegue a formar ningún cristal. Por tanto, una de las estrategias comunes para mejorar el crecimiento de cristales de calidad adecuada es el sembrado o *seeding*, que consiste en insertar núcleos cristalinos ya formados en una nueva gota de cristalización. Si la gota se encuentra en condiciones metaestables se asegura la presencia de uno sólo o unos pocos núcleos, que crecerán hasta dar lugar a un único cristal o unos pocos de tamaño apropiado para los estudios de difracción por rayos X. Los núcleos deben proceder preferentemente de cristales de la misma proteína o complejo que no sean ni muy

grandes ni tengan demasiado tiempo, ya que los defectos se acumulan en el cristal a medida que este crece.

En este trabajo se empleó normalmente la técnica de *micro-seeding* para mejorar la calidad de los cristales, que es la más sencilla de realizar aunque menos reproducible. Para ello se utilizó una herramienta de *seeding* (Figura 3.6A), que se pasa haciendo pinceladas sobre la superficie del cristal madre para ayudar a desprenderse y atrapar los núcleos cristalinos. Posteriormente, la herramienta de *seeding* (similar a un pelo) se pasa a través de la nueva gota, depositando los núcleos a lo largo de su recorrido.

Alternativamente, para conseguir ralentizar la cinética de la cristalización, se puede cubrir el reservorio de la disolución de cristalización con una capa de aceite, disminuyendo así la velocidad de evaporación. De este modo se retarda el establecimiento del equilibrio entre la gota y el reservorio, y con ello se produce un tránsito más lento por el estado de sobresaturación. (En cambio, el uso de parafinas es desaconsejable ya que no permiten una difusión suficiente del vapor y el riesgo de que la gota se seque es elevado). Típicamente se emplean aceites de silicona para cubrir el reservorio, aunque en nuestro caso se utilizó con éxito el aceite de oliva. Otro factor importante a considerar con esta técnica es el espesor de la capa de aceite, que en nuestro caso varió entre 2 y 2.5 mm (200 - 250  $\mu$ l de aceite).



**Figura 3.6 Técnica de micro-seeding para el crecimiento de cristales de proteína.** A. Herramienta empleada para sembrar núcleos cristalinos. Dispone de un pelo muy fino que toca el cristal madre (B), y que es posteriormente pasado a lo largo de la superficie de la nueva gota de cristalización, como se indica en C. Figuras extraídas de la página web de Hampton Research ([www.hamptonresearch.com](http://www.hamptonresearch.com)).

Otros parámetros que se pueden variar para influir en el proceso de cristalización son los volúmenes de la disolución de cristalización en el reservorio y de la gota, así como la proporción entre los volúmenes de la disolución de proteína y de cristalización en la gota inicial. En este trabajo, por ejemplo, se realizaron rastreos empleando proporciones 1:1, 1:2, 2:1, 2:3 y 3:2 entre la disolución de proteína y la disolución de cristalización. Finalmente, cabe destacar

que en ocasiones es posible hacer crecer cristales de tamaño apropiado a partir de disoluciones de cristalización en las que se han obtenido microcristales, realizando pequeñas variaciones en la concentración del agente precipitante, añadiendo ciertos aditivos o variando ligeramente (en 0.1 - 0.2 unidades) el pH de la disolución de cristalización.

#### **3.7.2.1.2 Técnicas posteriores al crecimiento**

Las técnicas de criocristalografía que se describen más abajo pueden provocar desórdenes en la red cristalina, sobre todo en los cristales más grandes en los que el contenido de disolvente es mayor, debido a las diferentes velocidades de contracción del disolvente y de la red cristalina al ser enfriados a muy bajas temperaturas (alrededor de -173 °C). (A pesar de no ser correcto, es común referirse a este proceso como “congelación”, y a los cristales de proteínas así tratados como “congelados”, y aquí mantendremos esos términos para simplificar). Los desórdenes de la red cristalina también pueden resultar de una congelación heterogénea. Estos desórdenes provocan un aumento de la mosaicidad del cristal, que mide el desorden de largo alcance del cristal y por tanto, una disminución de la resolución.

Para revertir el desorden debido a una defectuosa congelación del cristal, éste se puede someter a un proceso de templado o *annealing*, que consiste en bloquear durante unos escasos segundos la corriente de nitrógeno criogénica dirigida hacia el mismo. De esta manera, se permite al agente crioprotector distribuirse homogéneamente a través del cristal de modo que al volver a congelarlo la contracción del mismo sea más parecida a la de la red cristalina.

#### **3.7.3 Recogida de los cristales y criopreservación**

---

La radiación de rayos X (RX) es muy energética y el cristal se ha de proteger para evitar que ésta lo destruya durante la recogida de datos de difracción, ya sea por impacto directo o por la acción de los radicales libres generados por la radiación. Para lograrlo, durante la medición se mantiene el cristal bajo una corriente de N<sub>2</sub> líquido, que tiene una temperatura alrededor de -173 °C (criopreservación). Por ello, y para evitar la formación de cristales de hielo, es necesario añadir a la disolución madre sustancias que impidan la cristalización del agua a tan bajas temperaturas, garantizando así la integridad del cristal de proteína al ser congelado. Los crioprotectores utilizados en este trabajo fueron el aceite mineral Fomblin® Y (Sigma-Aldrich) y el glicerol. Los cristales crecidos en condiciones del kit *Morpheus*<sup>TM</sup> de

Molecular Dimensions fueron congelados directamente en N<sub>2</sub> líquido, ya que sus formulaciones incluyen agentes crioprotectores a las concentraciones adecuadas.

Los cristales se recogieron directamente de las gotas con ayuda de unos lazos de nailon y *LithoLoops*<sup>TM</sup> (Molecular Dimensions) de diferentes tamaños (0.05-0.1, 0.1-0.2 ó 0.2-0.3 mm), los cuales están montados sobre un pequeño perno que se encuentra a su vez insertado en un cabezal magnético (adquiridos de Hampton Research o de Molecular Dimensions; ver Figura 3.7). La manipulación de los cristales se realiza bajo observación constante a través de una lupa. Tras extraerlos de la gota, los cristales se sumergen rápidamente en una gota del agente crioprotector, e inmediatamente se introducen en nitrógeno líquido. Finalmente, el lazo con el cristal se introduce en un vial que queda cerrado gracias al cabezal magnético. Los cristales se mantienen en N<sub>2</sub> hasta su análisis utilizando radiación de rayos X.



**Figura 3.7 Sistema utilizado para congelar, conservar y analizar los cristales.** Los cristales se montan dentro de un lazo de nailon (*loop*), situado en el extremo de un perno metálico (*pin*), el cual por el otro extremo se encuentra insertado en un cabezal magnético que servirá para situarlo en un goniómetro, y alinear el cristal dentro del haz de radiación de RX. Imagen adaptada de la página web de Hampton Research ([www.hamptonresearch.com](http://www.hamptonresearch.com)).

#### 3.7.4 Recogida de los datos de difracción

Para obtener el patrón de difracción de un cristal de proteína, el cristal montado en un lazo de nailon se coloca sobre el cabezal de un goniómetro y se ajusta de modo tal que quede centrado en el haz de RX. Para la recogida de los datos, el goniómetro se rota en incrementos fijos (típicamente de 0.5 a 1 grado dependiendo, como se explica a continuación, del tamaño de la celda y la mosaicidad del cristal). Los RX colimados mediante espejos de silicio emergen de la fuente e inciden sobre el cristal de proteína, produciendo un patrón de difracción que queda registrado en un detector de RX. Dependiendo de las instalaciones utilizadas, en nuestro trabajo se utilizaron diferentes detectores (Tabla 3.4).

La recolección de un conjunto completo de datos de difracción de un cristal requiere conocer previamente la simetría del mismo, los parámetros de la celdilla unidad, su orientación



y el límite de resolución. Con esta información se puede establecer una estrategia apropiada para la recogida de un conjunto de datos completo y robusto (es decir, donde la gran mayoría de los reflejos sea registrado varias veces, como mínimo 3). La magnitud fundamental a tener en cuenta al diseñar una estrategia es el ángulo que ha de ser rotado el cristal (a menor simetría, mayor es el ángulo a rotar). Posteriormente, la calidad del conjunto de datos colectado se reflejará en los parámetros correspondientes de completitud (*completeness*) y de redundancia. La información necesaria para el indexado del cristal, y con ello para definir una estrategia de colecta de datos, se obtuvo recogiendo previamente de cada cristal un pequeño número de espectros de difracción (al menos dos, medidos en posiciones perpendiculares entre sí).

| Haces de rayos X en ESRF y ALBA | Energía (keV)    | Diámetro del haz      | Detector             |
|---------------------------------|------------------|-----------------------|----------------------|
| ID14-1                          | 13.3 (fija)      | 50-200 $\mu\text{m}$  | ADSC Q210 CCD        |
| ID14-2                          | 13.3 (fija)      | 50-300 $\mu\text{m}$  | ADSC Q4R CCD         |
| ID14-4                          | 9-15 (modulable) | 30-80 $\mu\text{m}$   | ADSC Q315R CCD       |
| ID23-1 (microfocus)             | 5-20 (modulable) | $\sim 35 \mu\text{m}$ | ADSC Q315R CCD       |
| ID23-2                          | 14.20 (fija)     | 10 $\mu\text{m}$      | Mar/Mosaic 225 CCD   |
| ID29                            | 6-20 (modulable) | 10-30 $\mu\text{m}$   | PILATUS 6M (DECTRIS) |
| BM30A                           | 7-18 (modulable) | 50-500 $\mu\text{m}$  | ADSC Q315R CCD       |
| BL13-XALOC (ALBA)               | 5-22 (modulable) | 50-300 $\mu\text{m}$  | PILATUS 6M (DECTRIS) |

**Tabla 3.4 Características de las líneas para macromoléculas biológicas de los sincrotrones ESRF (Grenoble) y ALBA (Barcelona) utilizadas para la recogida de los datos de difracción.**

Estas imágenes iniciales permiten evaluar, en primer lugar, la calidad del cristal y determinar su posible anisotropía y, en segundo lugar, determinar la información cristalográfica básica mencionada anteriormente (posible grupo espacial y constantes de celda) para la recogida de un conjunto completo de datos de difracción. Para el análisis de estos datos se empleó el programa MOSFLM [Leslie, 1992]. La mayoría de los datos de difracción de rayos X fueron recolectados en las instalaciones del sincrotrón de Grenoble, ESRF, en las líneas ID-14, ID-23, ID-29 o BM-30; mientras que los últimos de ellos en la línea BL13-XALOC del sincrotrón de Barcelona, ALBA (ver detalles en la Tabla 3.4). La recogida de los datos de difracción fue controlada por el programa MxCuBE [Gabadinho, 2010].

### 3.7.5 Procesamiento de los datos de difracción: integración y reducción de datos

Cada reflexión registrada puede interpretarse como proveniente de un plano de difracción con un índice de Miller,  $hkl$ , y con una intensidad que depende de la densidad electrónica que contiene dicho plano,  $I_{hkl}$ . Una vez registrados los patrones de difracción de cada una de las imágenes, es preciso determinar las intensidades que corresponden a cada una de las reflexiones. Para este fin se empleó el programa iMOSFLM [Leslie, 2006, Battye, Kontogiannis, *et al.*]; a continuación se resumen brevemente los pasos realizados para la evaluación de los datos de difracción con este software.

En primer lugar, se indexaron los datos, es decir, se determinaron a partir de una (o unas pocas imágenes, sobre todo en los casos de cristales que solo difractan a baja resolución), los grupos espaciales posibles, la orientación del cristal y las dimensiones de la celdilla unidad. Con estos datos, se asigna a cada imagen una orientación y a cada reflexión registrada su índice de Miller,  $hkl$ .

Seguidamente, se procedió a la integración propiamente dicha de los datos. Este paso consiste en medir la intensidad de cada reflexión particular (cada *spot*), ajustándola a una distribución de Gauss. Cada reflexión se ajusta a una "caja" que sirve para normalizar el ruido de fondo asociado a cada reflexión, causado, entre otros factores, por la difracción difusa del disolvente. El resultado de la integración de las intensidades es un fichero de tipo mtz (nombrado así en honor a sus creadores, Sandra McLaughlin, Howard Terry y Jan Zelinka), el cual contiene toda la información acerca de las intensidades de los *spots*, imagen a imagen, asociadas a una reflexión ( $hkl$ ).

El siguiente paso es la reducción de estas intensidades a los módulos de los **factores de estructura,  $F(hkl)$** , que están relacionados con las coordenadas de los átomos ( $x_j$ ,  $y_j$ ,  $z_j$ ) que ocupan la unidad asimétrica del cristal, mediante la ecuación de onda (ecuación 3.1):

$$F(hkl) = \sum_{j=1}^N f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)}$$

**Ecuación 3.1** Relación entre el factor de estructura correspondiente a un haz difractado con un índice de Miller ( $hkl$ ), y la posición ocupada por los átomos individuales dentro de la celdilla unidad ( $x_j$ ,  $y_j$ ,  $z_j$ , expresada en unidades fraccionarias).  $f_j$  es el factor de dispersión del átomo  $j$ , y  $N$  es el número total de átomos.

Los factores de estructura representan las ondas resultantes de la dispersión de todos los átomos en cada una de las direcciones del espacio. Los módulos de los factores de

estructura están directamente relacionados con las intensidades de las reflexiones del espectro, y para su cálculo se empleó la suite de programas del CCP4i [Collaborative Computational Project, 1994], y en particular el programa SCALA [Evans, 1993].

Matemáticamente, el mapa de densidad electrónica no es más que la transformada de Fourier de los factores de estructura con sus fases correspondientes ( $\Phi_{hkl}$ ), y su cálculo permite conocer el valor de la densidad electrónica en cada punto de la malla tridimensional (ver ecuación 3.2). Sin embargo, para obtener el mapa de densidad electrónica completo, es necesario conocer las fases de las ondas de difracción, las cuales no es posible extraer de ningún dato experimental. Esto es el llamado problema de las fases, y para resolverlo se procedió como se explica en el epígrafe siguiente.

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} \sum_{\mathbf{k}} \sum_{\mathbf{l}} |F(\mathbf{hkl})| \cos 2\pi(\mathbf{hx} + \mathbf{ky} + \mathbf{lz} - \phi(\mathbf{hkl}))$$

**Ecuación 3.2 Función de la densidad electrónica.** Está definida en cada punto de la celdilla unidad, de coordenadas (x, y, z). Representa la transformada de Fourier entre el espacio real, definido por la densidad electrónica,  $\rho(xyz)$ , y el llamado espacio recíproco, definido por los índices de Miller ( $hkl$ ).

### 3.7.6 Resolución de las estructuras cristalinas

Como se ha descrito anteriormente, para la obtención de una estructura cristalina por difracción de RX se necesita primero resolver el problema de las fases, de las cuales no se recoge ninguna información durante la exposición del cristal a la radiación. En nuestro caso, el método empleado para determinar esta información fue el de reemplazamiento molecular, que se basa en utilizar una estructura similar conocida para derivar unos valores de fases iniciales ( $\Phi_{\text{calc}}$ ), a partir de los cuales es posible calcular un mapa de densidad electrónica inicial, e ir aproximando a los valores de las fases reales mediante ciclos iterados de modelaje en la densidad electrónica obtenida y refinamiento (ver más abajo).

Este método implica rotar y trasladar la estructura conocida (el modelo) dentro de la nueva red cristalina. La búsqueda sistemática de la posible posición (o posiciones) del modelo dentro de la celdilla unidad conduce en general, a un problema en seis dimensiones (es necesario determinar tres ángulos y tres desplazamientos a lo largo de los ejes). Sin embargo, este problema se puede reducir a uno notablemente más sencillo en tres dimensiones, determinando primero los ángulos que es necesario rotar el modelo para que su orientación coincida con la de la estructura a determinar, y luego las translaciones correspondientes para

una óptima superposición. En este trabajo, para la búsqueda de las soluciones de reemplazamiento molecular se utilizó el programa Molrep [Vagin, 1997], según está implementado en la suite CCP4i, y como modelos de búsqueda, las estructuras de las moléculas de trombina humana y bovina depositadas en el PDB (códigos 1PPB y 1AVG, respectivamente), previamente truncadas para eliminar regiones particularmente flexibles.

### **3.7.6.1 Cálculo de los mapas de densidad electrónica y refinamiento de la estructura**

El conocimiento de las fases permite resolver la ecuación de la densidad electrónica (Ecuación 3.2) para obtener una representación (mapa) tridimensional de la densidad electrónica, y en el que es posible construir el modelo de la proteína cristalizada. La calidad de un mapa de densidad electrónica depende de la calidad de los datos de difracción recogidos, fundamentalmente de la resolución obtenida (a mayor resolución, mejor es el mapa y el nivel de detalle que permite observar). Se considera que se ha encontrado la solución de una estructura cuando se obtiene un mapa interpretable en términos de la cadena de aminoácidos conocida. A partir de este momento comienza la etapa de trazado y refinamiento. El trazado consiste en inspeccionar el mapa y situar las cadenas polipeptídicas y otros elementos presentes en el cristal (moléculas orgánicas pequeñas, grupos prostéticos, moléculas del disolvente, etc.) en las regiones del mapa a las que se ajuste el aminoácido o molécula específica. Dependiendo de la calidad de los datos puede hacerse de forma manual, o automática, esto último sólo si la resolución es suficientemente alta (mayor de 2.5 Å).

En nuestro caso, el ajuste se realizó manualmente inspeccionando los mapas de densidad electrónica con los programas MiFIT 8 de Rigaku/MSD ([www.rigaku.com](http://www.rigaku.com)) y COOT (*Crystallographic Object-Oriented Toolkit*) 0.6.2 de la Universidad de Oxford, UK [Emsley, Lohkamp, *et al.*, 2010]. Para ello se calcularon inicialmente mapas de diferencias entre las amplitudes observadas ( $F_{\text{obs}}$  o  $F_o$ ) y las calculadas ( $F_{\text{calc}}$  o  $F_c$ ), usando las fases calculadas una vez posicionado el modelo de búsqueda en la unidad asimétrica ( $\Phi_{\text{calc}}$ ).

Los mapas más usados para el trazado se calcularon tomando como coeficientes las diferencias  $2F_o - F_c$  y  $F_o - F_c$ . Los mapas  $2F_o - F_c$  tienen un peso doble en la amplitud observada respecto de la calculada, y a medida que avanza el refinamiento deben coincidir con la densidad electrónica “real”. Los mapas  $F_o - F_c$  ayudan a la interpretación de partes conflictivas de las estructuras. Generalmente son más intensos en las zonas donde hay errores en la estructura, o esta no ha sido trazada todavía. Las zonas donde “faltan” átomos tienen una

densidad positiva ( $F_o > F_c$ ), y las zonas donde hay átomos incorrectamente situados tendrán densidad negativa ( $F_c > F_o$ ). En la estructura final, estos mapas deberán presentar densidad cercana a cero, ya que se igualan los dos componentes. Cuando se trabaja con coeficientes cercanos a cero los mapas  $F_o - F_c$  son mucho más “ruidosos” que los  $2F_o - F_c$ , por lo que es necesario inspeccionar a un nivel de sigma más elevado. Generalmente representamos los mapas  $2F_o - F_c$  y los  $F_o - F_c$  a niveles de  $1\sigma$  y de  $\pm 2.5\sigma$ , respectivamente.

Por regla general, se comenzó el trazado reintroduciendo las regiones de la trombina que habían sido excluidas del modelo de búsqueda, pero para las cuales aparecía densidad electrónica interpretable en los primeros mapas calculados. A partir de estos mapas, se construyó iterativamente el modelo de la trombina y, en su caso de los ligandos discernibles en los mapas de densidad electrónica, seguidos de ciclos de refinamiento. Debido a que el número de observaciones (reflexiones medidas) es insuficiente para poder realizar un refinamiento independiente de las posiciones atómicas ( $x, y, z$ ) y los valores  $B$ , se aplicaron restricciones estereoquímicas al modelo. En este trabajo se ha utilizado la suite de programas CCP4 6.2.0 para realizar el refinamiento estructural, y en particular las diferentes opciones que incluye el programa Refmac5 [Murshudov, Vagin, *et al.*, 1997], según está implementado en CCP4i.

### **Factor R**

El factor R, es un indicador de cuán bien se ajusta el modelo obtenido a los datos de difracción medidos experimentalmente. Se calcula a partir de la desviación entre las amplitudes observadas y las calculadas.

$$R = \frac{\sum |F_{obs} - F_{calc}|}{\sum |F_{obs}|}$$

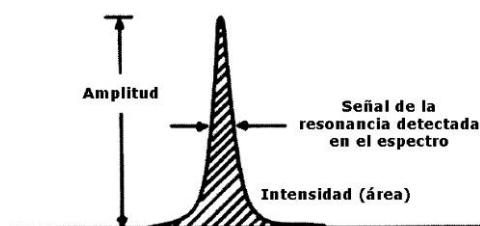
Los factores R se utilizan como indicadores de calidad durante todo el proceso de refinamiento del modelo. Así, un aumento en el factor R nos indicará que los cambios introducidos en un modelo no se ajustan adecuadamente a los datos. Este indicador necesita un control interno, denominado  $R_{free}$ , que se calcula con un número de reflexiones (normalmente, 5% de las medidas) que no son incluidas en el proceso de refinamiento, y que por tanto son una medida más fidedigna del progreso de este proceso, y de la calidad del modelo final.

### 3.7.7 Publicación de la estructura

Las coordenadas de los átomos de cada modelo molecular y los valores B se almacenan en un fichero de tipo .pdb. Este archivo tiene un formato estándar que permite su uso en todos los programas de cristalografía y de representación tridimensional de estructuras. Este fichero se encuentra en un formato ASCII, fácilmente editable, que asigna una fila a cada átomo, especificando el tipo de átomo y el residuo al que pertenece, sus coordenadas (x, y, z) y su factor de temperatura. También contiene otras entradas que especifican el grupo espacial, las dimensiones de la celda, las condiciones de cristalización y la publicación derivada del modelo molecular, entre otros. Existe un banco de datos, el *Protein Data Bank* ([www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/)) que almacena todas las coordenadas de los modelos de proteína determinados por cristalografía de rayos X o RMN en solución.

### 3.8 ESTUDIOS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DEL FRAGMENTO FVIIIa1

La espectroscopía mediante resonancia magnética nuclear de proteínas (RMN de proteínas) se utiliza para obtener información sobre la estructura y dinámica de las proteínas. Esta técnica se basa en las propiedades magnéticas que tienen algunos núcleos atómicos sometidos a un campo magnético externo para absorber radiación electromagnética a una determinada radiofrecuencia que depende del tipo de núcleo y del entorno químico que rodea a estos núcleos. Entre los núcleos atómicos más importantes para RMN de moléculas orgánicas están el  $^1\text{H}$ , el  $^{13}\text{C}$  y el  $^{15}\text{N}$ . Este tipo de núcleos atómicos poseen un momento magnético (*nuclear spin*) que les permite tener diferentes frecuencias de resonancia ó desplazamientos químicos (*chemical shifts*) en un campo magnético, y que usualmente varían dependiendo del entorno químico en el que se encuentren (por ejemplo, los átomos a los que están unidos, la longitud de los enlaces, los ángulos entre los mismos, etc.) [Reid, MacLachlan, *et al.*, 1997]. Para obtener este tipo de información relevante de macromoléculas biológicas se requiere realizar experimentos mono-, bi- y tri-dimensionales de distintos núcleos. Además, las resonancias han de alcanzar una amplitud e intensidad suficientes para ser detectadas por los equipos de RMN (Figura 3.8) [Wuthrich, 2003]. Cabe resaltar que, al formarse complejos macromoleculares, algunas señales del espectro se pueden ensanchar, y en algunos casos quedar debajo del umbral de detección del equipo [Lane and Lefevre, 1994].



**Figura 3.8 Representación de la señal de un espectro monodimensional de RMN en el que se indican algunas de sus características básicas.** Al formarse un complejo macromolecular, algunas señales del espectro se pueden ensanchar, y pueden quedar por debajo del umbral de detección. Se muestra la amplitud, la intensidad y el umbral de detección de la señal, derivado de la fórmula  $W_{1/2} = 1/(\pi T_2)$ , donde  $W_{1/2}$  se refiere al valor medio de la anchura de la radiofrecuencia de los átomos involucrados en la señal de resonancia detectada, y  $T_2$  es el tiempo de relajación del *spin-spin* de los núcleos atómicos implicados [Lane and Lefevre, 1994].

### 3.8.1 Materiales

Para los estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) se empleó tanto la trombina libre como inhibida irreversiblemente con FPR, así como en presencia de un exceso de Hir-C (ver epígrafe 3.1.1), y se utilizó el factor de la coagulación X (FX) humano, y el ácido trimetilsilil propianoico (TSP) como estándar de referencia interna. Para los ensayos de RMN se generó el fragmento recombinante FVIIIa1 uniformemente marcado con nitrógeno-15 ( $^{15}\text{N}$ ) y/o carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ). Para ello, el FVIIIa1 se expresó en cepas de *E. coli* pLysS en medio mínimo M9 suplementado con cloruro de amonio- $^{15}\text{N}$ , como única fuente de nitrógeno y/o  $^{13}\text{C}$  D-glucosa, como única fuente de carbono (ver epígrafe 3.3.5.1 y Anexo 5).

### 3.8.2 Experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN)

El fragmento FVIIIa1 marcado, el factor X, la trombina libre y la trombina inhibida con FPR fueron exhaustivamente dializados contra 25 mM de fosfato de sodio pH 6.0, 25 mM NaCl, 500  $\mu\text{M}$  EDTA y 5 mM de TCEP, y posteriormente se les adicionó agua deuterada a una concentración final de 15% (v/v). En los experimentos que lo requerían, la Hir-C fue disuelta en el mismo tampón y adicionada a la trombina en una relación molar de 10:1. Todos los experimentos de RMN fueron realizados en el mismo tampón y al mismo pH para excluir los efectos de diferencias en las velocidades de intercambio debidas al solvente, y con un volumen de muestra de 600  $\mu\text{l}$  en tubos para RMN de 5 mm de diámetro.

Primeramente, se realizaron experimentos monodimensionales de protón ( $^1\text{H}$ ) a concentraciones decrecientes del fragmento FVIIIa1 (de 850 a 100  $\mu\text{M}$ ) y a diferentes temperaturas (de 5 a 25  $^{\circ}\text{C}$ ) en un espectrómetro Bruker DMX 500 MHz equipado con una sonda a temperatura ambiente de triple resonancia (TXI, 5 mm), para identificar las condiciones

en las que el FVIIIa1 se comporta como una especie monodispersa. Una vez establecidas las condiciones óptimas se realizaron ensayos de correlación de dos dimensiones  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (ó HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , *Heteronuclear Single Quantum Correlation*) a una temperatura de 5 °C y con una concentración de FVIIIa1 de 200  $\mu\text{M}$ . Estos experimentos HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  permiten evaluar la dispersión de las resonancias del protón amida ( $^1\text{H}$ ) correlacionadas con las del nitrógeno ( $^{15}\text{N}$ ) de los enlaces peptídicos de los diferentes residuos presentes en el fragmento FVIIIa1, y aparecen como un pico en el espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (Con excepción, por supuesto, de los residuos de prolina que carecen del protón amida).

Para evaluar las interacciones intermoleculares del FVIIIa1 con la trombina o el factor X, se colectaron espectros de dos dimensiones  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del fragmento del cofactor en presencia de diferentes concentraciones de trombina libre (20 o 40  $\mu\text{M}$ ), trombina inhibida irreversiblemente con FPR (10, 20, o 40  $\mu\text{M}$ ), trombina previamente incubada con un exceso de Hir-C (20 o 40  $\mu\text{M}$ ), ó del factor X (10 o 20  $\mu\text{M}$ ), respectivamente.

### **3.8.2.1 Experimentos para la asignación de las resonancias mediante protón ( $^1\text{H}$ ) y carbono ( $^{13}\text{C}$ )**

Para la asignación de las resonancias del esqueleto de carbonos  $\alpha$  y  $\beta$  del conector FVIIIa1 mediante protón ( $^1\text{H}$ ) se realizaron experimentos de triple resonancia estándares HNCO, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB y CBCA(CO)NH [Case, Dyson, *et al.*, 1994] en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz-US equipado con una criosonda de triple resonancia (TCI, 5 mm). Estos estudios de RMN se realizaron en el *Parc Científic* de Barcelona en colaboración con el Prof. Miquel Pons (Grupo de RMN Biomolecular, Programa de Biología Estructural y Computacional, *Institut de Recerca Biomèdica* (IRB) - *Parc Científic*, Universidad de Barcelona).

Para la asignación mediante  $^{13}\text{C}$ , se realizaron experimentos monodimensionales  $^1\text{H}$  y bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (HSQC) y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (CON) preliminares en un espectrómetro Bruker UltraShield 700 MHz con una sonda CPTX03 calibrada para carbono-13. Posteriormente, se realizaron un conjunto de experimentos de doble (CACO, CBCACO) y de triple resonancia (CBCACON y CBCANCO) estándares [Case, Dyson, *et al.*, 1994] en el *Centro di Risonanze Magnetiche* (CERM) en colaboración con la Dra. Isabella C. Felli (Departamento de Química, Universidad de Florencia, Italia).



Para estos ensayos de asignación se trabajó con el FVIIIa1 doblemente marcado, tanto con carbono-13 como con nitrógeno-15 (FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ ) (ver epígrafe 3.3.5.1), a una concentración de 400  $\mu\text{M}$  y en presencia de 40  $\mu\text{M}$  de trombina libre. Los espectros de RMN colectados fueron procesados con *NMRPipe* [Delaglio, Grzesiek, *et al.*, 1995] o Top Spin<sup>TM</sup> 1.3, y para la asignación de las resonancias del esqueleto de carbonos  $\alpha$  y  $\beta$  del fragmento recombinante se empleó el programa *CARA* (Computer-Aided Resonance Assignment; [www.nmr.ch](http://www.nmr.ch))<sup>4</sup> junto con la tabla de desplazamientos químicos de aminoácidos de la Base de Datos de Resonancia Magnética (BMRB, [www.bmrb.wisc.edu](http://www.bmrb.wisc.edu)). Finalmente, los resultados se visualizaron e interpretaron con el programa *NMRViewJ* (One Moon Scientific, Inc.).

---

<sup>4</sup> Keller, Rochus. *Optimizing the Process of Nuclear Magnetic Resonance Spectrum Analysis and Computer Aided Resonance Assignment*. Disertación en el Instituto de Tecnología Federal Suizo de Zurich (*ETH Zürich*) para optar por el grado de Doctor en Ciencias Naturales. ETH No. 15947 (2004/2005).



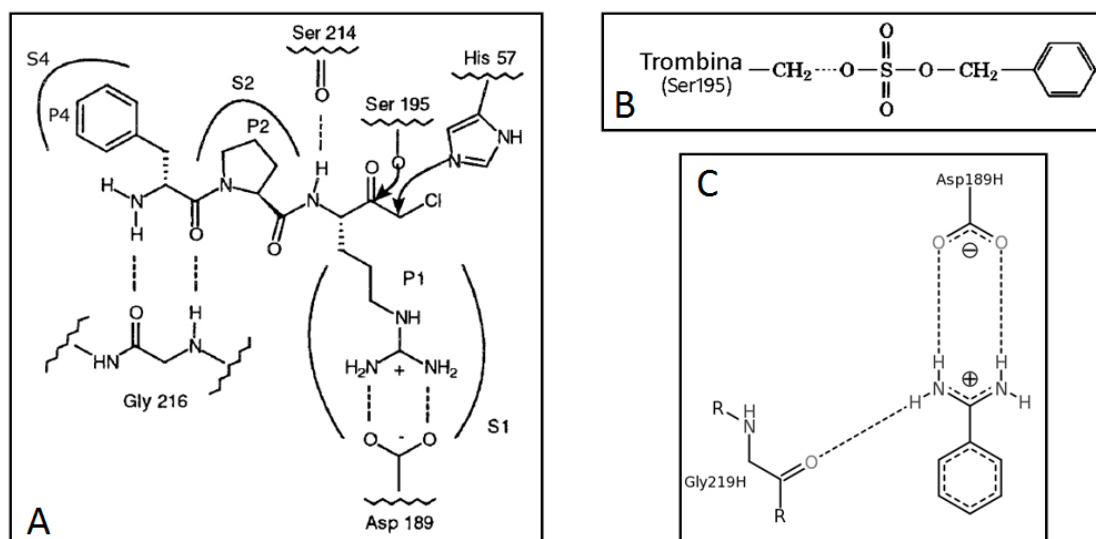
## 4. RESULTADOS



#### 4.1 LIGANDOS ESPECÍFICOS DEL SITIO ACTIVO Y DEL EXOSITIO I MODULAN LA ESTABILIDAD Y PLASTICIDAD DE LA TROMBINA

Con el objetivo de estudiar los efectos sobre la estructura de la trombina causados por ligandos específicos del sitio activo y del exosito I, en este epígrafe se presentan los resultados obtenidos en ensayos de digestión enzimática y de termoestabilidad, complementados con información de estructuras de trombina libre e inhibida resueltas por cristalografía de rayos X.

En los casos correspondientes, la trombina se incubó previamente con los siguientes inhibidores competitivos, siguiendo lo indicado en el epígrafe de Materiales y Métodos. (1) El inhibidor FPR-clorometilcetona (FPR, D-Phe-Pro-Arg-clorometilcetona) cuyo residuo de arginina modificado forma enlaces covalentes con los residuos Ser<sup>195</sup> e His<sup>57</sup> del sitio activo de la trombina activa, inhibiéndola irreversiblemente (Figura 4.1A). (2) El inhibidor irreversible fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), el cual se une covalentemente a través de su grupo sulfonilo a la cadena lateral de la Ser<sup>195</sup> (Figura 4.1B). (3) La benzamidina, un inhibidor competitivo reversible que es un análogo de la cadena lateral de la arginina, y que ocupa de forma específica el bolsillo S<sub>1</sub> de la proteinasa (Figura 4.1C). Finalmente (4), el fragmento C-terminal (Gly<sup>54</sup>-Gln<sup>65</sup>) de la hirudina (Hir-C), es un inhibidor no competitivo que interacciona específicamente con el exosito I de la trombina (ver Figura 1.17A) [Corral-Rodriguez, Macedo-Ribeiro, *et al.*, 2010].



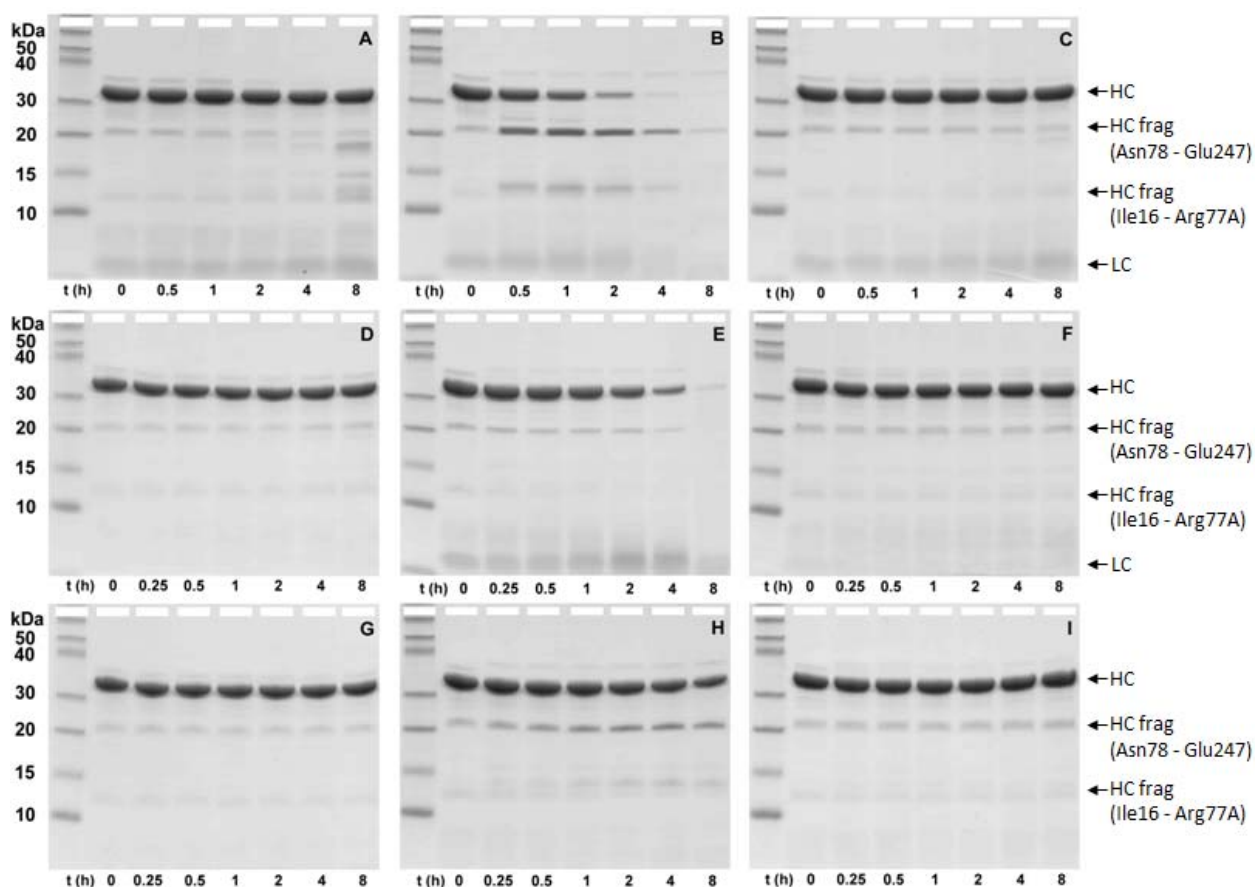
**Figura 4.1 Resumen esquemático de los mecanismos de interacción entre el centro activo de la trombina y los ligandos que utilizamos en esta investigación.** A. Se evidencia la interacción del FPR con los bolsillos S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> y S<sub>4</sub> del sitio activo de la proteasa. B. Se representa la unión entre la Ser<sup>195</sup> de la trombina con el grupo sulfonilo del PMSF. C. Se muestran las interacciones de la benzamidina en el bolsillo S<sub>1</sub>. Figura A modificada de [Dahlgren, Branalt, *et al.*, 2002].

#### 4.1.1 La ocupación del sitio activo de la trombina reduce la accesibilidad del lazo 70-80 a la endoproteinasa Arg-C

Como se mencionó en la introducción, la protrombina es hidrolizada por el Factor Xa, libre o formando parte del complejo protrombinasa, entre los residuos Arg<sup>272(1I)</sup>-Thr<sup>285(1H)</sup> y entre Arg<sup>320(15)</sup>-Ile<sup>321(16)</sup>. Estos cortes proteolíticos generan la trombina activa, formada por una cadena ligera N-terminal (LC; 36 aminoácidos, ~4 kDa) y una cadena pesada (HC; 259 residuos, ~30 kDa) que contiene el sitio activo de la proteinasa; ambas cadenas se mantienen unidas covalentemente mediante un enlace disulfuro. Cabe mencionar que la trombina activa puede derivar por autólisis o por proteólisis en sus dos formas menos activas, la trombina- $\beta$ , por un corte en el enlace Arg<sup>75</sup>-Tyr<sup>76</sup>, y la trombina- $\gamma$ , generada por un corte adicional en la trombina- $\beta$  entre los residuos de Lys<sup>149E</sup> y Gly<sup>150</sup>, por ello la calidad del estado inicial de la trombina fue esencial para obtener óptimos resultados en nuestros experimentos. Aprovechando la presencia de residuos de arginina expuestos en el lazo 70-80 que es parte esencial del exosito I de la trombina, en este ensayo se utilizó la endoproteinasa Arg-C para estudiar la accesibilidad de este lazo a proteólisis en la trombina libre, la trombina reversiblemente inhibida con benzamidina, y la trombina irreversiblemente inhibida con FPR. Se realizaron controles de digestión con albúmina de suero bovino, los cuales evidenciaron en particular que la benzamidina no inhibe la Arg-C (ver Anexo 7 y epígrafe 3.2.1 de Materiales y Métodos). Además, se realizaron controles en ausencia de la endoproteinasa Arg-C (Figura 4.2 A, D, G) y adicionando 20 mM de EDTA a la reacción de digestión para inhibir la endoproteinasa, ya que a estas altas concentraciones del agente quelante el ión Ca<sup>2+</sup> requerido para la actividad de la misma es capturado (Figura 4.2 C, F, I) [Mitchell, 1977].

Los resultados experimentales de estos ensayos de proteólisis limitada evidencian que la trombina libre es mucho más sensible a proteólisis, demostrado por la aparición de dos nuevas bandas de ~20 kDa y ~10 kDa correspondientes a los fragmentos de digestión generados a partir de la cadena pesada, al incubarla con la endoproteinasa Arg-C por unos 30 min (Figura 4.2B). A partir de las 4 h de incubación se puede observar una degradación casi total de la trombina. Con respecto a los resultados de las muestras de trombina inhibida con benzamidina (inhibidor reversible que sólo ocupa el bolsillo de especificidad S<sub>1</sub> de la trombina) se observa una degradación mucho más gradual de la cadena pesada en presencia de la Arg-C (Figura 4.2E). Sin embargo, en el caso de la trombina inhibida irreversiblemente con FPR, la trombina

se mantiene estable aun en presencia de la endoproteinasa Arg-C, lo que se visualiza con la presencia de la cadena pesada de la trombina incluso luego de 8 h de incubación (Figura 4.2H).



**Figura 4.2 Evidencia de la digestión preferencial del lazo 70-80 en la cadena pesada de la trombina libre en presencia de la endoproteinasa Arg-C.** Aproximadamente 80  $\mu$ g de proteína fueron digeridas con 0.5  $\mu$ g de la endoproteinasa Arg-C (en una relación enzima:proteína de 1:160) en 90 mM Tris-HCl, 8.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, pH 7.6. Las alícuotas correspondientes fueron tomadas en los tiempos indicados, analizadas por SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie (ver Materiales y Métodos). Se indican con una flecha la cadena ligera (LC, ~4 kDa), la pesada (HC, ~30 kDa) y los fragmentos de la cadena pesada generados por la proteólisis parcial de la trombina (HC frag, ~20 kDa y ~10 kDa) debidos a la endoproteinasa Arg-C. En los fragmentos de la HC se indican los residuos de los extremos N- y C-terminales hipotéticos (numeración de la HC de la proteína humana). Muestras de trombina libre (A-C), trombina inhibida con benzamidina (D-F) y trombina inhibida con FPR (G-I) fueron evaluadas en ausencia (A, D y G) o en presencia de Arg-C (B, E y H), así como en presencia de Arg-C inhibida con 20 mM de EDTA (C, F e I). Como se puede observar en el panel B, la cadena pesada (HC; ~30 kDa) de la trombina libre es rápidamente digerida por la endoproteasa Arg-C (desde los 30 min. de incubación), generando los fragmentos correspondientes a ~20 kDa y ~10 kDa de la cadena pesada. Se observa también como a las 4 h la proteólisis de la trombina libre es prácticamente total. En E, se observa que la intensidad de la banda correspondiente a la cadena pesada de la trombina se reduce gradualmente sin que se acumulen los fragmentos de la HC, hasta alcanzarse la degradación total de la trombina a las 8 h. En el panel H se observa que la trombina inhibida con FPR, permanece sin digerir luego de 8 h de incubación con la endoproteinasa Arg-C.

#### 4.1.2 Estabilidad térmica de la trombina en presencia de ligandos que se unen al sitio activo o al exosito I

La microcalorimetría diferencial de barrido (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) permite cuantificar la estabilidad térmica de una proteína y evaluar el efecto de diferentes

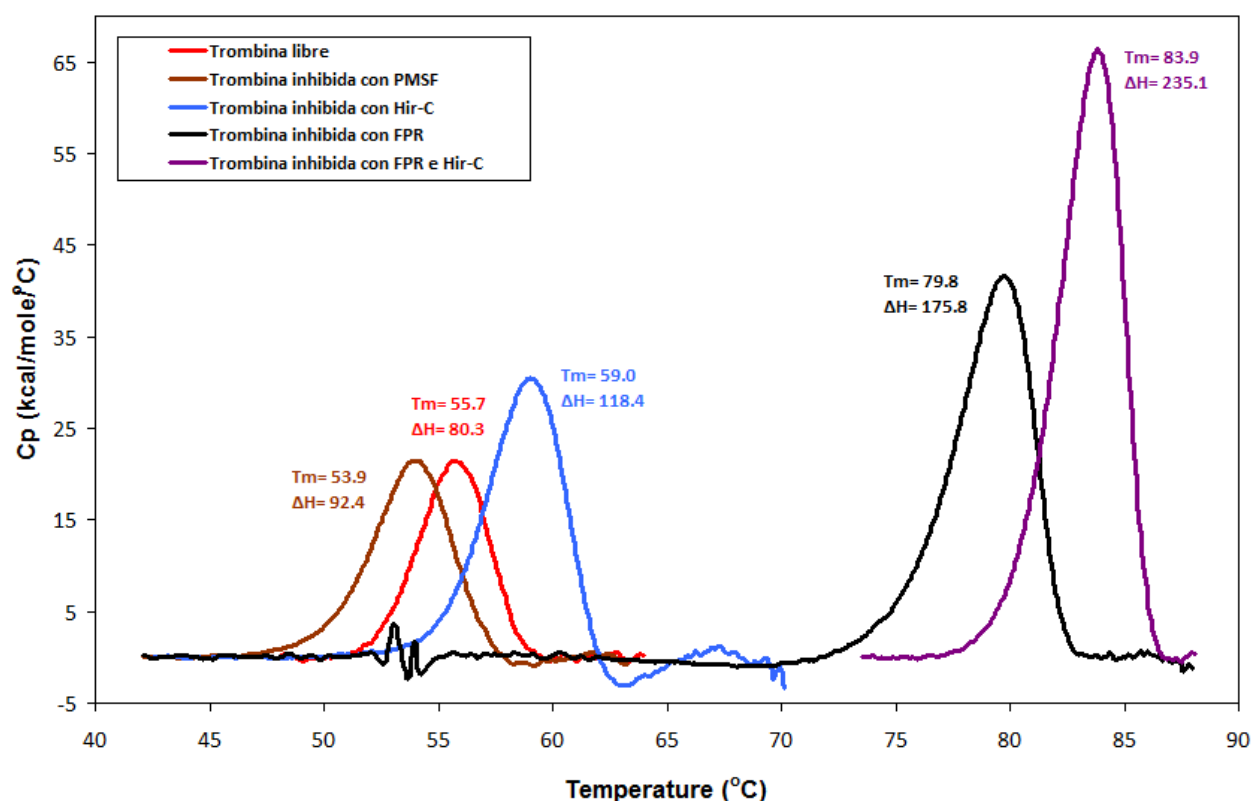
ligandos sobre esta propiedad, cuantificable a través de los valores de la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ , *melting temperature*), del cambio en la energía absorbida ( $\Delta H$ , entalpía) y del cambio en la capacidad calórica ( $\Delta C_p$ ) asociados con el desplegamiento de la proteína al ser calentadas gradualmente. En este trabajo se evaluó la estabilidad térmica de diferentes especies de trombina libre o en presencia de ligandos específicos. Las muestras se prepararon por duplicado y a concentraciones de 1 mg/ml ( $\sim 27 \mu\text{M}$ ), se dializaron exhaustivamente en 25 mM PIPES pH 6.5, 150 mM NaCl antes de los experimentos de DSC (ver epígrafe 3.2.2 de Materiales y Métodos). La comparación de las muestras de trombina libre y unida a los diferentes ligandos evidenció diferencias significativas. Por ejemplo, la temperatura de desnaturalización de la trombina libre es de  $55.7^\circ\text{C}$  ( $\Delta H=80.3 \text{ kcal}$ ) mientras que en presencia de Hir-C y FPR estos valores incrementan hasta registrar una  $T_m=83.9^\circ\text{C}$  ( $\Delta H=235.1 \text{ kcal}$ ) (Tabla 4.1 y Figura 4.3).

| Variantes de trombina | Temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ; $^\circ\text{C}$ ) | Energía absorbida ( $\Delta H$ ; kcal) | Capacidad calórica ( $C_p$ ; kcal/mol/ $^\circ\text{C}$ ) |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Trombina              | 55.7                                                          | 80.3                                   | 22.1                                                      |
| Trombina-PMSF         | 53.9                                                          | 92.4                                   | 22.3                                                      |
| Trombina-Hir-C        | 59.0                                                          | 118.4                                  | 31.4                                                      |
| Trombina-FPR          | 79.8                                                          | 175.8                                  | 42.7                                                      |
| Trombina-FPR-Hir-C    | 83.9                                                          | 235.1                                  | 66.2                                                      |

**Tabla 4.1 Valores termodinámicos de la trombina libre y trombina en presencia de ligandos específicos del sitio activo y del exosito I.** Nótese el incremento en los tres parámetros termodinámicos al estar presente algún ligando de la proteasa, a excepción del valor de  $T_m$  en presencia de PMSF.

Estos ensayos de DSC también permitieron determinar que tanto la estabilización del exosito I ( $\Delta T_m= +3.3^\circ\text{C}$ ,  $\Delta H= +38.1 \text{ kcal}$ ), como de forma más notable al ocuparse el sitio activo con FPR ( $\Delta T_m= +24.1^\circ\text{C}$ ,  $\Delta H= +95.5 \text{ kcal}$ ) de la proteinasa conduce a una estabilización de la misma. Por el contrario, la derivatización de la Ser<sup>195</sup> del sitio activo con PMSF parece conducir a una desestabilización de la proteinasa ( $\Delta T_m= -1.8^\circ\text{C}$ ,  $\Delta H= +12.1 \text{ kcal}$ ). Adicionalmente, estos ensayos permitieron establecer que la ocupación del exosito I en la proteinasa inhibida irreversiblemente con FPR conduce a una estabilidad todavía más notable de su estructura con incrementos en la temperatura de desnaturalización ( $\Delta T_m= +4.1^\circ\text{C}$ ), pero sobre todo en la energía absorbida ( $\Delta H= +59.3 \text{ kcal}$ ), claramente superiores a los que produce la cola C-terminal de la hirudina en la proteinasa libre. Estos resultados permiten concluir que tanto la ocupación del sitio activo (FPR) como en menor medida la del exosito I (Hir-C) incrementan la estabilidad

térmica de la trombina, ya que la trombina requiere absorber una mayor cantidad de energía para desplegarse, desnaturalizándose y perdiendo así su estructura tridimensional natural.



**Figura 4.3 Incremento de la estabilidad térmica de la trombina en presencia de ligandos específicos del sitio activo y del exosito I.** El incremento de la estabilidad térmica se evaluó mediante microcalorimetría diferencial de barrido, analizando la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) y el cambio en la energía absorbida ( $\Delta H$ ) de la trombina libre (rojo) y de la proteasa en presencia de diferentes ligandos según se indica en la leyenda de la figura. Las muestras se prepararon a una concentración de 1 mg/ml y se dializaron exhaustivamente en 25 mM PIPES, pH 6.5, 150 mM NaCl. Los ensayos de DSC se realizaron incrementando la temperatura 1.5 °C/min, desde los 20 hasta los 95 °C (ver Materiales y Métodos). Se observa como el Hir-C (celeste) y el FPR (negro) estabilizan a la trombina libre incrementando tanto el valor de  $T_m$  como el de  $\Delta H$ . Nótese el incremento en la temperatura de desnaturalización y en la energía absorbida en la muestra de trombina incubada tanto con FPR como con Hir-C (morado).

#### 4.1.3 Análisis de la estabilidad térmica de la trombina mediante termofluorescencia diferencial

La termofluorescencia diferencial se basa en los mismos principios bioquímicos y biofísicos de la microcalorimetría diferencial (DSC; ver epígrafe anterior), pero es en general más sensible por utilizar el incremento de la fluorescencia del agente *SPYRO Orange* para determinar la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) de las proteínas. Este fluoróforo presenta afinidad por las regiones hidrofóbicas de las proteínas que son expuestas a medida que estas se desnaturalizan, incrementando así la fluorescencia, alcanzando un valor máximo a la temperatura de desnaturalización de la proteína en cuestión. Dada la sensibilidad de esta



técnica, las muestras de trombina a estudiar se analizaron a una concentración mucho más baja que en los experimentos de DSC ( $\sim 1 \mu\text{M}$ ) y en un volumen de reacción de 20  $\mu\text{l}$ . Los ensayos de termofluorescencia se realizaron a diferentes relaciones molares de trombina y sus ligandos (1:1, 1:5 y 1:10), obteniéndose esencialmente los mismos resultados a las tres relaciones molares (Tabla 4.2).

| Proteína             | $T_m$ promedio y desviación estándar |
|----------------------|--------------------------------------|
| Trombina             | $54.50 \pm 0.00$                     |
| Trombina-PMSF        | $51.97 \pm 0.10$                     |
| Trombina-Benzamidina | $53.93 \pm 0.25$                     |
| Trombina-Hir-C       | $55.04 \pm 0.90$                     |
| Trombina-FPR         | $74.00 \pm 0.00$                     |
| Trombina-FPR-Hir-C   | $77.08 \pm 0.10$                     |

**Tabla 4.2** Desviación estándar de los valores de la temperatura de desnaturalización de las diferentes relaciones molares de trombina y ligandos específicos del sitio activo y del exosito I. Nótese como el agregar un exceso de ligando hace variar de forma mínima la temperatura de desnaturalización.

Por esta razón, para poder comparar mejor con los ensayos de microcalorimetría presentados en el epígrafe anterior, en la tabla 4.3 se presentan los valores promedio correspondientes a la relación molar 1:10 (la gráfica correspondiente se presenta en el Anexo 8). Como se observa, los resultados de termofluorescencia diferencial son similares a los obtenidos en los ensayos de microcalorimetría. En particular, estos resultados confirman que la inhibición de la trombina tanto reversiblemente con benzamidina o con Hir-C, pero sobre todo de forma irreversible con FPR, estabiliza la proteinasa contra la desnaturalización térmica. También, de acuerdo con los resultados de DSC, la trombina inhibida con el PMSF posee una  $T_m$  más baja ( $51.9^\circ\text{C}$ ) que la trombina libre. Por otra parte, se confirmó también que la unión del FPR y la cola C-terminal de la hirudina a la vez estabilizan aún más a la proteasa.

| Variantes de trombina | Temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ; $^\circ\text{C}$ ) |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------|
| Trombina              | 54.5                                                          |
| Trombina-PMSF         | 51.9                                                          |
| Trombina-Benzamidina  | 54.2                                                          |
| Trombina-Hir-C        | 56.0                                                          |
| Trombina-FPR          | 74.0                                                          |
| Trombina-FPR-Hir-C    | 77.1                                                          |

**Tabla 4.3** Temperatura promedio de desnaturalización de la trombina libre y trombina en presencia de ligandos específicos del sitio activo y del exosito I obtenida mediante termofluorescencia diferencial. Nótese el incremento adicional al utilizar los ligandos FPR e Hir-C.

#### 4.1.4 Evidencia cristalográfica de la plasticidad de la trombina

La plasticidad de la trombina queda patente también al comparar estructuras cristalinas resueltas a alta resolución ( $\sim 1.7$  Å) de la proteasa libre e inhibida con FPR; así como de otras estructuras de la proteinasa no reportadas previamente en la literatura (resoluciones entre 2.3 y 2.7 Å). El análisis de estas estructuras tridimensionales (Tablas 4.4 y 4.7, y Anexo 10) reveló cambios estructurales en diferentes regiones de interés de la trombina, principalmente el sitio activo y los exositos I y II, aunque los inevitables contactos con moléculas vecinas ya sea dentro de multímero o con moléculas relacionadas cristalográficamente, limitan la magnitud de los desplazamientos que puedan experimentar los lazos flexibles de la trombina. Estos análisis nos permitieron obtener información relevante sobre la plasticidad de la trombina según se detalla a continuación.

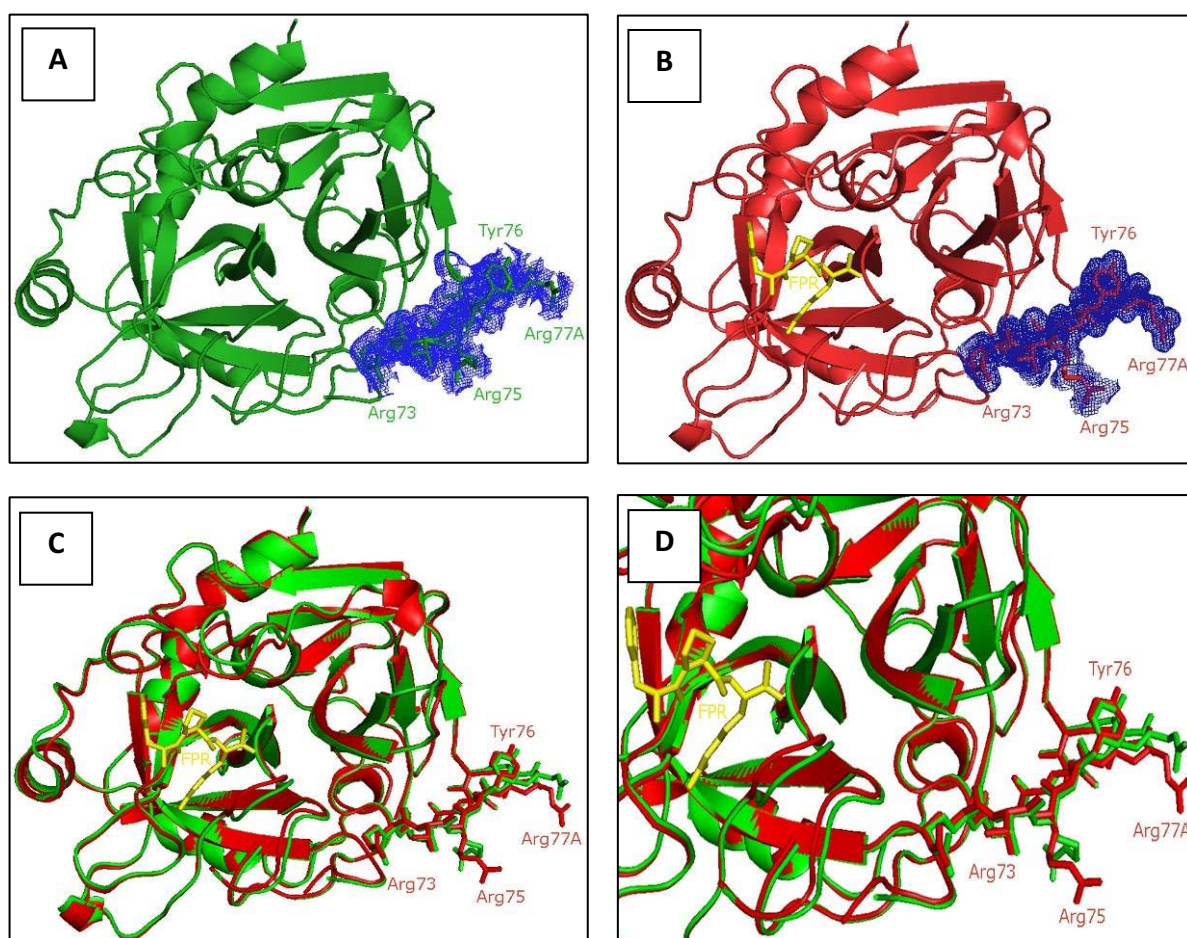
| Condición de cristalización      | Resolución (Å) | Grupo espacial | Dimensiones de la celda unidad (Å)                                                                 | Cristal                                                                               |
|----------------------------------|----------------|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Trombina</b>                  |                |                |                                                                                                    |                                                                                       |
| Morpheus 1-24                    | 1.7            | $P2_12_12_1$   | $a = 52.09$ Å, $b = 77.85$ Å, $c = 83.48$ Å<br>$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$                |  |
| <b>Trombina inhibida con FPR</b> |                |                |                                                                                                    |                                                                                       |
| Hampton Research 1-22            | 1.7            | C2             | $a = 69.49$ Å, $b = 72.08$ Å, $c = 69.84$ Å<br>$\alpha = \gamma = 90^\circ$ , $\beta = 97.7^\circ$ |  |

**Tabla 4.4 Características de los cristales empleados para resolver las estructuras de trombina libre y trombina inhibida con FPR a resolución casi atómica.** Se indica la condición de cristalización, la resolución obtenida, el grupo espacial, las dimensiones de la unidad asimétrica y una foto del cristal.

##### 4.1.4.1 Comparación del exosito I y II y del sitio activo en estructuras monoméricas de trombina libre e inhibida con FPR

La estructura tridimensional de la trombina libre se obtuvo a partir de un cristal de 0.2-0.3 mm aproximadamente, el cuál difractó a una resolución máxima de 1.7 Å utilizando radiación de sincrotrón. El análisis de los datos de difracción reveló que los cristales pertenecen al grupo espacial ortorrómbico  $P2_12_12_1$ , y presentan una única molécula de trombina en la unidad asimétrica (ver Tabla 4.5). El mapa de densidad electrónica evidencia una mayor

flexibilidad del lazo 70-80 del exosito I, particularmente de las cadenas laterales de algunos residuos como Arg<sup>73</sup>, Arg<sup>75</sup>, Tyr<sup>76</sup> y Arg<sup>77A</sup>, indicada por una densidad electrónica más pobre para estos residuos, comparado con otros lazos expuestos (Figura 4.4A). Asimismo, la inspección de la estructura reveló que el grupo guanidinio de la cadena lateral de la Arg<sup>75</sup> está orientado hacia el cuerpo de la molécula de trombina al compararlo con la molécula de trombina inhibida con FPR (Figura 4.4B, C y D).



**Figura 4.4 Comparación de las estructuras 3D de trombina libre e inhibida con FPR.** Las moléculas de trombina y de trombina inhibida irreversiblemente con FPR se representan en color verde y rojo, respectivamente. Se destacan en representación de *stick* los residuos Ser<sup>72</sup>-Asn<sup>78</sup> del lazo 70-80 del exosito I y los mapas de densidad electrónica calculados después de posicionar los modelos de búsqueda se indican como una malla azul. **A.** Se representa la estructura de la trombina detallándose el lazo 70-80 del exosito I, donde se evidencia más pobre la densidad electrónica correspondiente a los residuos Arg<sup>75</sup>, Tyr<sup>76</sup> y Arg<sup>77A</sup>. **B.** Estructura de la trombina-FPR con la representación del mapa de densidad electrónica del lazo 70-80 del exosito I. Se evidencia claramente la densidad electrónica de la Arg<sup>75</sup>, Tyr<sup>76</sup> y la Arg<sup>77A</sup>. En *sticks* de color amarillo se representa el inhibidor FPR. **C.** Superposición de las dos estructuras anteriores que permiten comparar las diferencias entre la trombina y la trombina-FPR. **D.** Ampliación del lazo 70-80 del exosito I. El inhibidor FPR genera cambios conformacionales sutiles en la molécula de trombina, entre ellos en el lazo 70-80. Figuras generadas con PyMol (DeLano Scientific LLC, San Carlos, California, EEUU).

| Recolección de datos                                 |                                                                               |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Fuente de RX                                         | ALBA BL-13                                                                    |
| Longitud de onda (Å)                                 | 0.97947                                                                       |
| Grupo espacial                                       | P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>                                 |
| Constantes de celda                                  | a = 52.09 Å, b = 77.85 Å, c = 83.48 Å<br>$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ |
| Resolución (última capa, Å)                          | 52.06 - 1.70 (1.79 - 1.70)                                                    |
| Número total de reflexiones                          | 645 409 (20 558)                                                              |
| Número de reflexiones únicas                         | 36 010 (5 449)                                                                |
| I/ $\sigma$ (I)                                      | 7.2 (2.5)                                                                     |
| Compleitud (%)                                       | 99.7 (99.7)                                                                   |
| Redundancia                                          | 3.8 (3.8)                                                                     |
| $R_{\text{merge}}^*$ (%)                             | 10.4 (43.1)                                                                   |
| Refinamiento y análisis del modelo                   |                                                                               |
| Resolución (última capa, Å)                          | 43.29 - 1.70 (1.74 - 1.70)                                                    |
| $R_{\text{factor}}^+$ (%)                            | 21.10 (22.00)                                                                 |
| $R_{\text{free}}^{\ddagger}$ (%)                     | 24.21 (27.00)                                                                 |
| Porcentaje de residuos con enlaces erróneos          | 0.00                                                                          |
| Porcentaje de residuos con ángulos erróneos          | 0.00                                                                          |
| Gráfico de Ramachandran (favorecidos / outliers) (%) | 97.40 / 0.00                                                                  |
| Clashscore (todos los átomos) <sup>§</sup>           | 3.6 (percentil 98) <sup>  </sup>                                              |
| Puntuación MolProbity <sup>¶</sup>                   | 1.82 (percentil 71) <sup>  </sup>                                             |

**Tabla 4.5 Parámetros estadísticos de la calidad de los datos de difracción y del refinamiento para la trombina cristalizada en el grupo espacial P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>.**

\* $R_{\text{merge}} = \sum_i \sum_j |I(h_i) - \langle I(h) \rangle| / \sum_i \sum_j I(h_i)$ , donde  $I(h_i)$  es la intensidad de la reflexión  $h$  determinada para la medida  $i$ , y  $\langle I(h) \rangle$  es el valor medio.

<sup>†</sup> $R_{\text{factor}} = \sum (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|) / \sum |F_{\text{obs}}|$ , donde  $|F_{\text{obs}}|$  y  $|F_{\text{calc}}|$  son las amplitudes del factor de estructura observado y calculado, respectivamente.

<sup>‡</sup> $R_{\text{free}}$ :  $R_{\text{factor}}$  calculado para un set de prueba seleccionado al azar que comprendía un 5% de las reflexiones totales y que fue excluido del refinamiento.

<sup>§</sup>Clashscore es el número de solapamientos estéricos graves ( $> 0.4$  Å) por 1000 átomos.

<sup>||</sup>El percentil 100 es el mejor entre las estructuras de resolución comparable ( $1.70 \pm 0.25$  Å); el percentil 0 es el peor.

<sup>¶</sup>La puntuación MolProbity se define como  $0.42574 \cdot \log(1 + \text{clashscore}) + 0.32996 \cdot \log(1 + \max(0, \% \text{RotOut} - 1)) + 0.24979 \cdot \log(1 + \max(0, 100 - \% \text{RamaFavored} - 2)) + 0.5$ , donde  $\% \text{RotOut}$  es el porcentaje de los rotámeros de cadena lateral no válidos y  $\% \text{RamaFavored}$  es el porcentaje de los residuos en las regiones favorecidas del diagrama de Ramachandran.

La estructura tridimensional de la trombina inhibida con FPR se resolvió a partir de un cristal ( $\sim 0.2$  mm) que difractó a una resolución máxima de 1.7 Å utilizando radiación de

sincrotrón. El procesamiento de los datos de difracción reveló que los cristales pertenecen al grupo espacial monoclinico C2, y presentan una única molécula de trombina en la unidad asimétrica (ver Tabla 4.6). Tras el reemplazamiento molecular el mapa de densidad electrónica evidenció una densidad completa y definida para el lazo 70-80, lo que sugiere una menor flexibilidad del mismo. En esta molécula las cadenas laterales de los residuos de Arg<sup>73</sup>, Tyr<sup>76</sup>, Arg<sup>77A</sup> y particularmente Arg<sup>75</sup> están orientadas hacia el solvente (Figura 4.4B, C y D). La orientación de estas cadenas laterales en la trombina-FPR podría explicar la resistencia de la misma a la proteólisis limitada por la endoproteinasa Arg-C, evitando los cortes que se realizan en los residuos de arginina del lazo 70-80 (ver Figura 4.2).

| Recolección de datos                                 |                                                                                              |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Fuente de RX                                         | ALBA BL-13                                                                                   |
| Longitud de onda (Å)                                 | 0.97947                                                                                      |
| Grupo espacial                                       | C2                                                                                           |
| Constantes de celda                                  | a = 69.49 Å, b = 72.08 Å, c = 69.84 Å<br>$\alpha = \gamma = 90^\circ$ , $\beta = 97.7^\circ$ |
| Resolución (última capa, Å)                          | 32.63 - 1.69 (1.78 - 1.69)                                                                   |
| Número total de reflexiones                          | 226 944 (18 262)                                                                             |
| Número de reflexiones únicas                         | 38 178 (5 548)                                                                               |
| I/ $\sigma$ (I)                                      | 13.5 (3.9)                                                                                   |
| Compleitud (%)                                       | 99.8 (99.5)                                                                                  |
| Redundancia                                          | 3.4 (3.3)                                                                                    |
| $R_{\text{merge}}^*$ (%)                             | 5.7 (28.8)                                                                                   |
| Refinamiento y análisis del modelo                   |                                                                                              |
| Resolución (última capa, Å)                          | 29.81 - 1.69 (1.73 - 1.69)                                                                   |
| $R_{\text{factor}}^{\dagger}$ (%)                    | 18.04 (25.00)                                                                                |
| $R_{\text{free}}^{\ddagger}$ (%)                     | 21.19 (27.00)                                                                                |
| Porcentaje de residuos con enlaces erróneos          | 0.18                                                                                         |
| Porcentaje de residuos con ángulos erróneos          | 0.00                                                                                         |
| Gráfico de Ramachandran (favorecidos / outliers) (%) | 97.05 / 0.00                                                                                 |
| Clashscore (todos los átomos) <sup>§</sup>           | 4.43 (percentil 96) <sup>  </sup>                                                            |
| Puntuación MolProbity <sup>¶</sup>                   | 1.85 (percentil 67) <sup>  </sup>                                                            |

**Tabla 4.6** Parámetros estadísticos de la calidad de los datos de difracción y del refinamiento para la trombina-FPR cristalizada en el grupo espacial C2. Para las definiciones de los parámetros ver el pie de la tabla 4.5. <sup>||</sup>El percentil 100 es el mejor entre las estructuras de resolución comparable ( $1.69 \pm 0.25$  Å); el percentil 0 es el peor.

Según los mapas de densidad electrónica, el exosito II (lazo 99 y hélice- $\alpha$  C-terminal) esta bien definido tanto en la trombina como en la trombina-FPR, y es prácticamente idéntico

en ambas estructuras. En ambas moléculas el lazo 149 (o lazo de autólisis) no revela densidad electrónica, indicando su procesamiento durante la cristalización o, más probablemente, su alta flexibilidad.

#### **4.1.4.2 Resolución de estructuras de trombina libre y trombina-FPR no descritas previamente en la literatura**

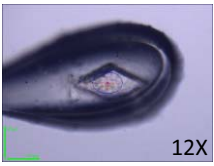
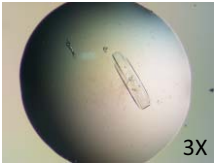
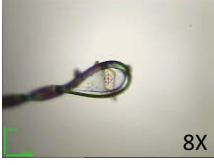
En el transcurso de esta investigación se resolvieron estructuras de trombina similares a otras reportadas previamente, en algunas ocasiones mejorando las ya conocidas (por ejemplo, mayor resolución). En este trabajo presentaremos solamente cuatro estructuras de trombina en las que los monómeros están empaquetados de forma tal que forman agregados (dímeros o tetrámeros) no descritos hasta el momento y, por tanto, los cristales correspondientes poseen dimensiones de celda no reportadas previamente. En la tabla 4.7 se presentan las características básicas de estas cuatro estructuras no descritas, obtenidas en presencia de diferentes fragmentos de sustratos fisiológicos.

##### **4.1.4.2.1 Tetrámero de trombina-FPR perteneciente al grupo espacial $P2_1$ , con dimensiones de celda: 66.5; 124.2; 75.5 (93.8)**

Tres de las nuevas estructuras pertenecen al grupo espacial monoclinico ( $P2_1$ ) y la restante al grupo espacial ortorrómbico ( $C222_1$ ). La primera estructura, un tetrámero de trombina inhibida con FPR, cuyos parámetros estadísticos de calidad se muestran en la tabla 4.8, se obtuvo por el procesamiento de cristales que crecieron en la condición *Pro-Plex 1-20* (ver epígrafe 3.7 de Materiales y Métodos). El análisis de esta estructura mostró que el tetrámero presente en la unidad asimétrica es estabilizado por extensas interacciones entre las cadenas ligeras del monómero AB de la proteinasa serínica con el monómero EF; y del monómero CD con el GH (ver Figura 4.5 A y B).

Las interacciones entre las cadenas ligeras se estabilizan principalmente por los grupos laterales de los residuos Glu<sup>13</sup>, Arg<sup>14D</sup>, Glu<sup>14H</sup>, así como por los residuos Pro<sup>204</sup> y Phe<sup>204A</sup> de la cadena pesada de estos monómeros, por ejemplo el grupo guanidinio de la Arg<sup>14D</sup> y carboxilato del Glu<sup>14H</sup> forman puentes salinos con el grupo carbonilo de Pro<sup>204</sup> y amino de Phe<sup>204A</sup>, respectivamente. Estas interacciones dan lugar a la formación de los dímeros AB/EF y CD/GH, que interaccionan entre sí principalmente a través de las cadenas pesadas de la proteasa para generar el tetrámero de trombina. Las interacciones son estabilizadas por residuos cargados y

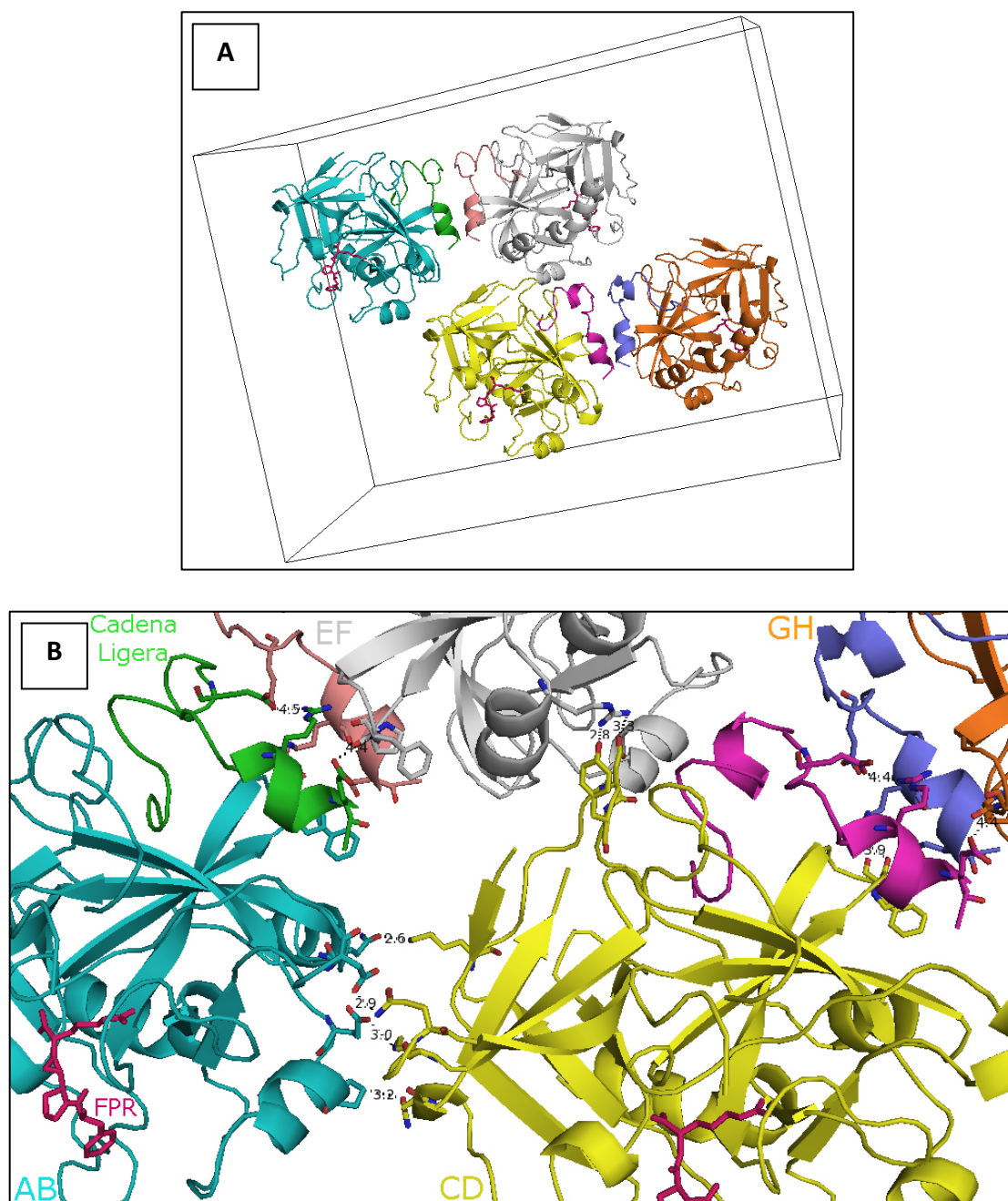
mediante las cadenas laterales de los mismos, por ejemplo los residuos Gln<sup>131</sup>, Glu<sup>164</sup>, Pro<sup>166</sup> y Asp<sup>188</sup> del monómero AB interaccionan con los residuos Lys<sup>110</sup>, Lys<sup>36</sup>, Asn<sup>62</sup>, y Gln<sup>38</sup> del monómero CD, respectivamente; y los residuos Asp<sup>116</sup> y Tyr<sup>117</sup> del monómero CD con la Arg<sup>126</sup> del monómero EF (ver Figura 4.5B). Por ejemplo, los grupos carboxilatos de los residuos Glu<sup>164</sup> y Asp<sup>188</sup> forman puentes salinos con la Lys<sup>36</sup> y Gln<sup>38</sup>, respectivamente.

| Descripción básica de los cristales de trombina obtenidos |                |                   |                                                                                              |                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------|----------------|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Condición de cristalización                               | Resolución (Å) | Grupo espacial    | Dimensiones de la celda unidad (Å)                                                           | Cristal                                                                               |
| Trombina-FPR incubada con exceso de FVIIIa1               |                |                   |                                                                                              |                                                                                       |
| Pro-Plex 1-20                                             | 2.49           | P2 <sub>1</sub>   | a = 66.54 Å, b = 124.17 Å, c = 75.49 Å<br>$\alpha = \gamma = 90^\circ, \beta = 93.8^\circ$   |    |
| Pro-Plex 1-18                                             | 2.45           | P2 <sub>1</sub>   | a = 89.41 Å, b = 77.49 Å, c = 126.29 Å<br>$\alpha = \gamma = 90^\circ, \beta = 109.96^\circ$ |   |
| Trombina incubada con exceso de FVIIIa3 R1689Q            |                |                   |                                                                                              |                                                                                       |
| Morpheus 1-25                                             | 2.29           | P2 <sub>1</sub>   | a = 66.14 Å, b = 146.44 Å, c = 68.01 Å<br>$\alpha = \gamma = 90^\circ, \beta = 94.2^\circ$   |  |
| Trombina incubada con exceso de FVIIIa1 R372Q             |                |                   |                                                                                              |                                                                                       |
| Morpheus 1-25                                             | 2.70           | C222 <sub>1</sub> | a = 90.65 Å, b = 95.92 Å, c = 145.54 Å<br>$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$               |  |

**Tabla 4.7 Características principales de los cristales obtenidos en diferentes condiciones de cristalización en los que se resolvieron estructuras de trombina libre o inhibida con FPR con dimensiones de celda no reportadas previamente.** Se indica la condición de cristalización, la resolución alcanzada, el grupo espacial, las dimensiones de la celda unidad y una foto del cristal.

Cabe resaltar que esta estructura, aunque era de trombina inhibida con FPR no presentó densidad electrónica para el lazo 70-80 del exosito I ni para el lazo 149 (o lazo de autólisis), mientras que las regiones correspondientes al lazo 37 del exosito I y al lazo 99 del exosito II sí están bien definidas por su densidad electrónica.





**Figura 4.5 Estructura de la trombina inhibida con FPR obtenida a partir de un cristal crecido en la condición de cristalización *Pro-Plex 1-20*.** **A.** La proteinasa serínica cristalizó en el sistema monoclinico ( $P2_1$ ), con cuatro moléculas en la unidad asimétrica designadas AB, CD, EF y GH. La hélice- $\alpha$  C-terminal de la cadena ligera de cada monómero es el elemento central de los contactos intermoleculares que dan lugar a la formación de dos dímeros AB-EF y CD-GH. Estos dímeros a su vez son estabilizados por contactos entre residuos de la cadena pesada. **B.** Vista detallada de la región de interacción entre las cuatro moléculas de trombina-FPR. Se representan los elementos de estructura secundaria de las moléculas y se muestran los átomos de C, O y N de las cadenas laterales de algunos de los residuos situados en la superficie de interacción de las moléculas. Se muestran algunas de las interacciones polares y de Van der Waals entre moléculas vecinas, indicando las distancias en angstroms (Å).



| Recolección de datos                                 |                                                                                               |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Fuente de RX                                         | ESRF ID23-2                                                                                   |
| Longitud de onda (Å)                                 | 0.8726                                                                                        |
| Grupo espacial                                       | P2 <sub>1</sub>                                                                               |
| Constantes de celda                                  | a = 66.54 Å, b = 124.17 Å, c = 75.49 Å<br>$\alpha = \gamma = 90^\circ$ , $\beta = 93.8^\circ$ |
| Resolución (última capa, Å)                          | 51.51 - 2.49 (2.62 - 2.49)                                                                    |
| Número total de reflexiones                          | 393 158 (25 501)                                                                              |
| Número de reflexiones únicas                         | 40 749 (6 237)                                                                                |
| I/ $\sigma$ (I)                                      | 6.2 (3.1)                                                                                     |
| Compleitud (%)                                       | 100.0 (99.9)                                                                                  |
| Redundancia                                          | 4.2 (4.1)                                                                                     |
| R <sub>merge</sub> * (%)                             | 13.6 (35.8)                                                                                   |
| Refinamiento y análisis del modelo                   |                                                                                               |
| Resolución (última capa, Å)                          | 48.27 - 2.75 (2.82 - 2.49)                                                                    |
| R <sub>factor</sub> <sup>†</sup> (%)                 | 25.63 (28.00)                                                                                 |
| R <sub>free</sub> <sup>‡</sup> (%)                   | 32.14 (34.00)                                                                                 |
| Porcentaje residuos con enlaces erróneos             | 0.02                                                                                          |
| Porcentaje residuos con ángulos erróneos             | 0.06                                                                                          |
| Gráfico de Ramachandran (favorecidos / outliers) (%) | 92.93 / 0.48                                                                                  |
| Clashscore (todos los átomos) <sup>§</sup>           | 8.43 (percentil 98) <sup>  </sup>                                                             |
| Puntuación MolProbity <sup>¶</sup>                   | 2.08 (percentil 93) <sup>  </sup>                                                             |

**Tabla 4.8** Parámetros estadísticos de la calidad de los datos de difracción y del refinamiento para la trombina-FPR cristalizada en el grupo espacial P2<sub>1</sub> a partir de la condición Pro-Plex 1-20. Al pie de la tabla 4.5 se definen los parámetros utilizados. <sup>||</sup> El percentil 100 es el mejor entre las estructuras de resolución comparable (2.49 ± 0.25 Å); el percentil 0 es el peor.

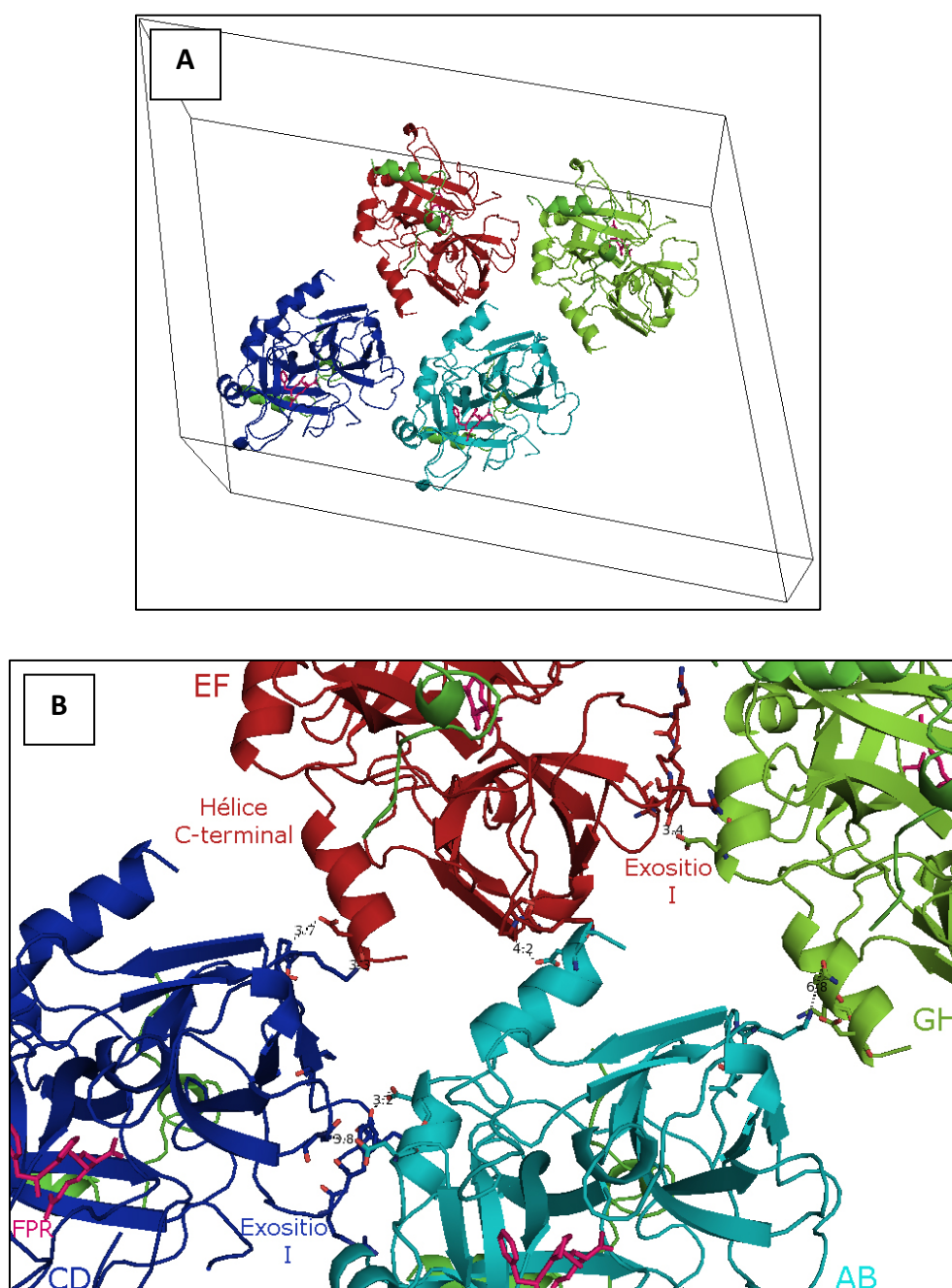
#### **4.1.4.2.2 Tetrámero de trombina-FPR perteneciente al grupo espacial P2<sub>1</sub>, con dimensiones de celda: 89.41; 77.49; 126.29 (109.96)**

Esta estructura se obtuvo a partir de cristales que crecieron en la condición *Pro-Plex 1-18* (ver tabla 4.7 y epígrafe 3.7). Las estadísticas de la recolección de datos y el refinamiento de esta estructura se presentan en la tabla 4.9. La unidad asimétrica contiene un tetrámero de trombina-FPR pero en el que los cuatro monómeros están ordenados de forma completamente diferente a la del tetrámero descrito en el epígrafe anterior. En esta estructura los cuatro monómeros de la unidad asimétrica presentaron densidad electrónica definida para los lazos 37 y 70-80 que forman el exosito I de la proteinasa, así como para el lazo 99 correspondiente al exosito II, pero no para el lazo 149 (o lazo de autólisis). Como se muestra en la figura 4.6B, los

residuos Arg<sup>75</sup> y Arg<sup>77A</sup> se orientan hacia el solvente, tal y como se ejemplificó previamente en la figura 4.4B. Esta estructura puede ser interpretada como un “dímero de dímeros”, en la que los contactos entre los monómeros AB y CD, al igual que el EF y GH, interaccionan entre sí a través del exosito I de la trombina, donde los lazos 37 y 70-80 de una molécula de trombina contactan la región de la hélice- $\alpha$  intermedia de la proteinasa vecina, por ejemplo, el OH del grupo fenólico de la Tyr<sup>76</sup> forma un enlace de hidrógeno con el carboxilato del Glu<sup>127</sup>, y los residuos Gln<sup>38</sup> y Asp<sup>178</sup> establecen interacciones de Van der Waals. A su vez, los dímeros formados, AB/CD y EF/GH, están estabilizados por contactos polares entre el Asp<sup>243</sup> de la hélice- $\alpha$  C-terminal de uno de los dímeros con los residuos Lys<sup>110</sup> y Pro<sup>111</sup> de la cadena pesada del dímero vecino (Figura 4.6B).

| Recolección de datos                                 |                                                                                           |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Fuente de RX                                         | ESRF ID23-1                                                                               |
| Longitud de onda (Å)                                 | 0.9763                                                                                    |
| Grupo espacial                                       | P2 <sub>1</sub>                                                                           |
| Constantes de celda                                  | a = 89.41 Å, b = 77.49 Å, c = 126.29 Å<br>$\alpha = \gamma = 90$ , $\beta = 109.96^\circ$ |
| Resolución (última capa, Å)                          | 59.35 - 2.45 (2.58 - 2.45)                                                                |
| Número total de reflexiones                          | 422 514 (60 651)                                                                          |
| Número de reflexiones únicas                         | 56 883 (8 685)                                                                            |
| I/ $\sigma$ (I)                                      | 6.8 (3.4)                                                                                 |
| Compleitud (%)                                       | 99.90 (99.8)                                                                              |
| Redundancia                                          | 7.1 (7.0)                                                                                 |
| R <sub>merge</sub> * (%)                             | 18.1 (53.2)                                                                               |
| Refinamiento y análisis del modelo                   |                                                                                           |
| Resolución (última capa, Å)                          | 59.35 - 2.45 (2.51 - 2.45)                                                                |
| R <sub>factor</sub> <sup>†</sup> (%)                 | 17.77 (21.00)                                                                             |
| R <sub>free</sub> <sup>‡</sup> (%)                   | 22.93 (31.00)                                                                             |
| Porcentaje residuos con enlaces erróneos             | 0.05                                                                                      |
| Porcentaje residuos con ángulos erróneos             | 0.15                                                                                      |
| Gráfico de Ramachandran (favorecidos / outliers) (%) | 94.37 / 0.18                                                                              |
| Clashscore (todos los átomos) <sup>§</sup>           | 6.38 (percentil 99) <sup>  </sup>                                                         |
| Puntuación MolProbity <sup>¶</sup>                   | 2.43 (percentil 76) <sup>  </sup>                                                         |

**Tabla 4.9** Parámetros estadísticos de la calidad de los datos de difracción y del refinamiento para la trombina-FPR cristalizada en el grupo espacial P2<sub>1</sub> a partir de la condición Pro-Plex 1-18. Al pie de la tabla 4.5 se definen los parámetros utilizados. <sup>||</sup> El percentil 100 es el mejor entre las estructuras de resolución comparable (2.45  $\pm$  0.25 Å); el percentil 0 es el peor.



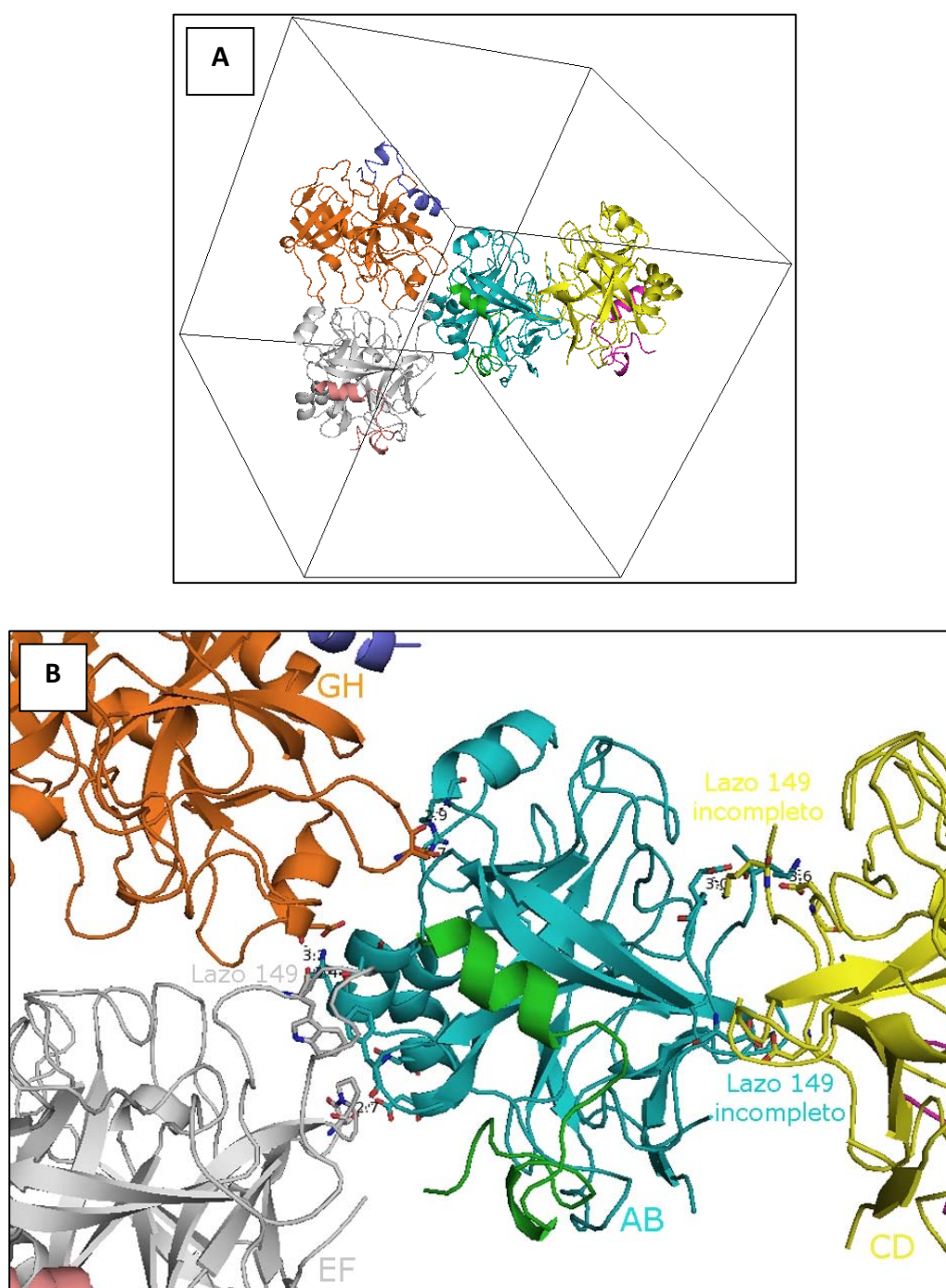
**Figura 4.6 Estructura 3D de la trombina inhibida con FPR obtenida a partir de un cristal crecido en la condición de cristalización *Pro-Plex 1-18*.** **A.** La proteinasa serínica cristalizó en el sistema monoclinico ( $P2_1$ ), con cuatro moléculas en la unidad asimétrica designadas AB, CD, EF y GH. Los monómeros de trombina establecen los contactos a través de sus cadenas pesadas. **B.** Vista detallada de la región de interacción entre las cuatro moléculas de trombina-FPR. Cabe destacar las interacciones entre los monómeros AB-CD ó GH-EF mediadas por la hélice- $\alpha$  intermedia y residuos del exosito I, y las interacciones entre las hélices- $\alpha$  C-terminales de un dímero con residuos de la cadena pesada del dímero vecino. Se muestran los átomos de C, O y N de las cadenas laterales de algunos de los residuos situados en la superficie de interacción de los monómeros, así como algunas interacciones polares y de Van der Waals, indicando las distancias en angstroms (Å).

#### 4.1.4.2.3 Tetrámero de trombina libre perteneciente al grupo espacial $P2_1$ , con dimensiones de celda: 66.14; 146.44; 68.01 (94.2)

Esta estructura se obtuvo a partir de cristales que crecieron en la condición *Morpheus 1-25* (tabla 4.7 y epígrafe 3.7). Los parámetros estadísticos de calidad de los datos de esta estructura tetramérica se presentan en la tabla 4.10. El mapa de densidad electrónica mostró que el lazo 70-80 no está definido en ninguna de las cuatro moléculas, mientras que en dos de ellas es visible el lazo 149 completo (monómeros EF y GH). Las cuatro moléculas de trombina presentes en la unidad asimétrica interactúan entre sí a través de diferentes regiones de las cadenas pesadas (ver Figuras 4.7A y B). Así, los monómeros AB y CD, establecen contactos a través de los pocos residuos del lazo 149 definidos por densidad electrónica (por ejemplo, puentes salinos entre los residuos recíprocos de Lys<sup>145</sup> de este lazo y Glu<sup>18</sup>).

| Recolección de datos                                 |                                                                                                |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Fuente de RX                                         | ESRF ID29                                                                                      |
| Longitud de onda (Å)                                 | 0.9600                                                                                         |
| Grupo espacial                                       | $P2_1$                                                                                         |
| Constantes de celda                                  | a = 66.14 Å, b = 146.44 Å, c = 68.01 Å<br>$\alpha = \gamma = 90^\circ$ , $\beta = 94.21^\circ$ |
| Resolución (última capa, Å)                          | 67.83 - 2.29 (2.42 - 2.29)                                                                     |
| Número total de reflexiones                          | 1 270 831 (25 394)                                                                             |
| Número de reflexiones únicas                         | 53 602 (8 263)                                                                                 |
| I/ $\sigma$ (I)                                      | 8.7 (2.7)                                                                                      |
| Complejidad (%)                                      | 98.0 (98.6)                                                                                    |
| Redundancia                                          | 3.0 (3.1)                                                                                      |
| $R_{\text{merge}}^*$ (%)                             | 7.2 (36.3)                                                                                     |
| Refinamiento y análisis del modelo                   |                                                                                                |
| Resolución (última capa, Å)                          | 65.96 - 2.29 (2.35 - 2.29)                                                                     |
| $R_{\text{factor}}^+$ (%)                            | 25.87 (44.00)                                                                                  |
| $R_{\text{free}}^{\ddagger}$ (%)                     | 32.02 (46.00)                                                                                  |
| Porcentaje residuos con enlaces erróneos             | 0.00                                                                                           |
| Porcentaje residuos con ángulos erróneos             | 0.11                                                                                           |
| Gráfico de Ramachandran (favorecidos / outliers) (%) | 92.10/ 0.76                                                                                    |
| Clashscore (todos los átomos) <sup>§</sup>           | 11.83 (percentil 88) <sup>  </sup>                                                             |
| Puntuación MolProbity <sup>¶</sup>                   | 2.35 (percentil 72) <sup>  </sup>                                                              |

**Tabla 4.10** Parámetros estadísticos de la calidad de los datos de difracción y del refinamiento para la trombina cristalizada en el grupo espacial  $P2_1$  a partir de la condición *Morpheus 1-25*. Al pie de la tabla 4.5 se definen los parámetros utilizados. <sup>||</sup>El percentil 100 es el mejor entre las estructuras de resolución comparable ( $2.29 \pm 0.25$  Å); el percentil 0 es el peor.



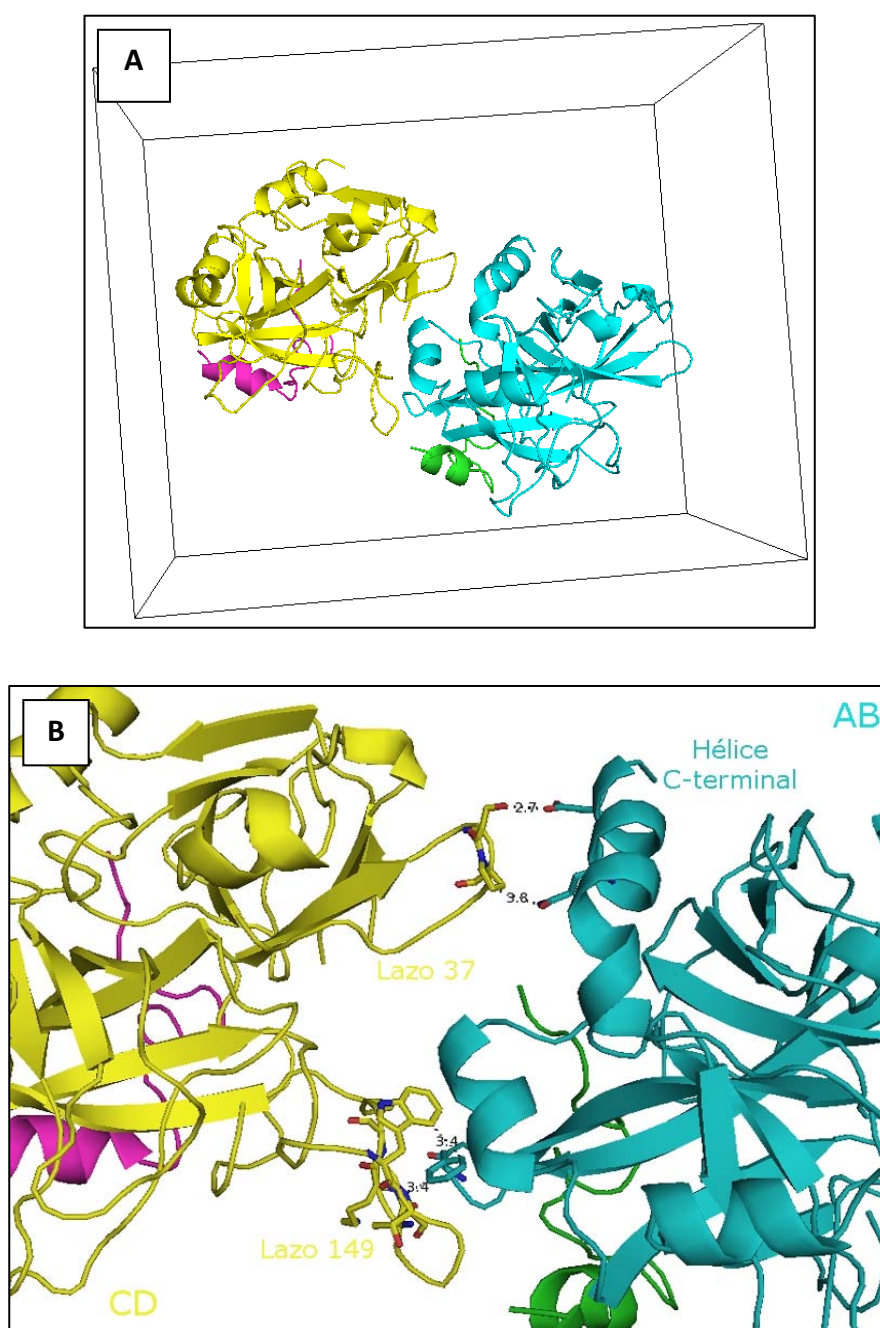
**Figura 4.7 Estructura 3D de la trombina humana obtenida a partir de un cristal crecido en la condición de cristalización *Morpheus* 1-25.** **A.** La trombina libre cristalizó en el sistema monoclinico, con cuatro moléculas en la unidad asimétrica. Los contactos entre las moléculas vecinas involucran residuos de la cadena pesada de cada monómero. **B.** Vista detallada del monómero AB, destacando las regiones de interacción con las otras tres moléculas de trombina de la unidad asimétrica, designadas CD, EF y GH, respectivamente. Los monómeros AB y CD de la proteinasa serínica interaccionan a través de los residuos de los lazos 149, mientras que las hélices- $\alpha$  del monómero AB establecen los contactos con los monómeros EF y GH. Se muestran los átomos de C, O y N de las cadenas laterales de algunos de los residuos situados en, o cerca de, las superficies de interacción de las moléculas, indicando las distancias en angstroms (Å).

Asimismo, el monómero AB interacciona a través de la hélice- $\alpha$  intermedia (Arg<sup>126</sup>-Leu<sup>129C</sup>) y la hélice- $\alpha$  C-terminal con el lazo 149 y el lazo 37, respectivamente, del monómero EF. Entre estas interacciones destacan los contactos polares entre los residuos de Ser<sup>129B</sup> y Asp<sup>243</sup>

con Trp<sup>148</sup> y Ser<sup>36A</sup>, respectivamente, así como interacciones hidrofóbicas entre Phe<sup>204A</sup> y Trp<sup>148</sup> (ver Figura 4.7B). Las interacciones entre los monómeros AB y GH se dan principalmente a través de las hélices- $\alpha$  intermedias de ambos monómeros y de los lazos 180 y 220 del monómero GH. Estas interacciones se estabilizan a través de puentes salinos entre residuos de carga opuestas como Arg<sup>126</sup> y Arg<sup>165</sup>, del monómero AB, con los aspartatos Asp<sup>170</sup> y Asp<sup>188</sup>, del monómero GH, respectivamente. Finalmente, los monómeros EF y GH interactúan entre sí extensivamente a través de varios lazos de la cadena pesada de la proteinasa serínica (lazos 60, 99, 149 y 220).

#### **4.1.4.2.4 Dímero de trombina libre perteneciente al grupo espacial C222<sub>1</sub>, con dimensiones de celda: 90.65; 95.92; 145.54 (90.0)**

La unidad asimétrica contiene un dímero de moléculas de la proteinasa libre, el cual es estabilizado por las cadenas pesadas de los monómeros, específicamente con la hélice- $\alpha$  intermedia (Arg<sup>126</sup> - Leu<sup>129C</sup>) y la hélice- $\alpha$  C-terminal de uno de los monómeros que interactúa con los lazos 149 y 37, respectivamente, de la molécula vecina (Figuras 4.8A y B). Entre estas interacciones destacan contactos hidrofóbicos entre Phe<sup>204A</sup> y Trp<sup>148</sup>, los contactos polares entre los residuos de Asp<sup>243</sup> y Ser<sup>36A</sup>; así como fuerzas de Van der Waals entre la Gln<sup>239</sup> y la Pro<sup>37</sup>, de los monómeros respectivos (Figura 4.8B). Cabe resaltar que los contactos de este dímero son similares a los observados para el dímero AB/EF de la estructura tetramérica presentada en el epígrafe anterior (4.1.4.2.3, ver Figura 4.7B). En esta estructura dimérica, ninguno de los dos monómeros de la unidad asimétrica presenta densidad electrónica definida para los residuos Lys<sup>70</sup> a Ile<sup>79</sup> del lazo 70-80. Además, únicamente el monómero CD presentó el lazo 149 o de autólisis, el cual es estabilizado por interacciones con el monómero adyacente (por ejemplo con la Phe<sup>204A</sup> y Trp<sup>148</sup>). Finalmente, se observó densidad electrónica correspondiente al lazo 99 en los dos monómeros presentes en la unidad asimétrica. Las estadísticas de la recolección de datos y el refinamiento de esta estructura se presentan en la tabla 4.11.



**Figura 4.8 Estructura 3D de la trombina humana cristalizada en el sistema ortorrómbico, obtenida a partir de un cristal crecido en la condición de cristalización *Morpheus 1-25*. A.** La trombina cristalizó en el sistema ortorrómbico ( $C222_1$ ), con dos moléculas en la unidad asimétrica. Los contactos entre las moléculas de trombina involucran principalmente a residuos de la cadena pesada de cada monómero. **B.** Vista detallada de la región de interacción entre las dos moléculas de trombina, que involucra las hélices- $\alpha$  intermedia (Arg<sup>126</sup>-Leu<sup>129C</sup>) y C-terminal del monómero AB y los lazos 37 y 149 del monómero CD. Se muestran los átomos de C, O y N de las cadenas laterales de algunos de los residuos situados en, o cerca de, la superficie de interacción de las moléculas, así como algunas interacciones polares y de Van der Waals importantes, indicando las distancias en angstroms (Å).



| Recolección de datos                                 |                                                                                 |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Fuente de RX                                         | ESRF ID29                                                                       |
| Longitud de onda (Å)                                 | 0.9600                                                                          |
| Grupo espacial                                       | C222 <sub>1</sub>                                                               |
| Constantes de celda                                  | a = 90.65 Å, b = 95.92 Å, c = 145.54 Å;<br>$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ |
| Resolución (última capa, Å)                          | 72.77 - 2.70 (2.85 - 2.70)                                                      |
| Número total de reflexiones                          | 489 900 (57 203)                                                                |
| Número de reflexiones únicas                         | 16 434 (2 458)                                                                  |
| I/ $\sigma$ (I)                                      | 5.7 (2.6)                                                                       |
| Compleitud (%)                                       | 97.8 (95.9)                                                                     |
| Redundancia                                          | 3.3 (3.1)                                                                       |
| $R_{\text{merge}}^*$ (%)                             | 13.3 (31.0)                                                                     |
| Refinamiento y análisis del modelo                   |                                                                                 |
| Resolución (última capa, Å)                          | 72.77 - 2.70 (2.77 - 2.70)                                                      |
| $R_{\text{factor}}^{\dagger}$ (%)                    | 29.01 (42.00)                                                                   |
| $R_{\text{free}}^{\ddagger}$ (%)                     | 36.28 (57.00)                                                                   |
| Porcentaje residuos con enlaces erróneos             | 0.14                                                                            |
| Porcentaje residuos con ángulos erróneos             | 0.26                                                                            |
| Gráfico de Ramachandran (favorecidos / outliers) (%) | 92.60 / 1.24                                                                    |
| Clashscore (todos los átomos) <sup>§</sup>           | 24.79 (percentil 71) <sup>  </sup>                                              |
| Puntuación MolProbity <sup>¶</sup>                   | 2.56 (percentil 67) <sup>  </sup>                                               |

**Tabla 4.11** Parámetros estadísticos de la calidad de los datos de difracción y del refinamiento para la trombina cristalizada en el grupo espacial C222<sub>1</sub> a partir de la condición Morpheus 1-25. Al pie de la tabla 4.5 se definen los parámetros utilizados. <sup>||</sup> El percentil 100 es el mejor entre las estructuras de resolución comparable (2.70 ± 0.25 Å); y el percentil 0 es el peor.

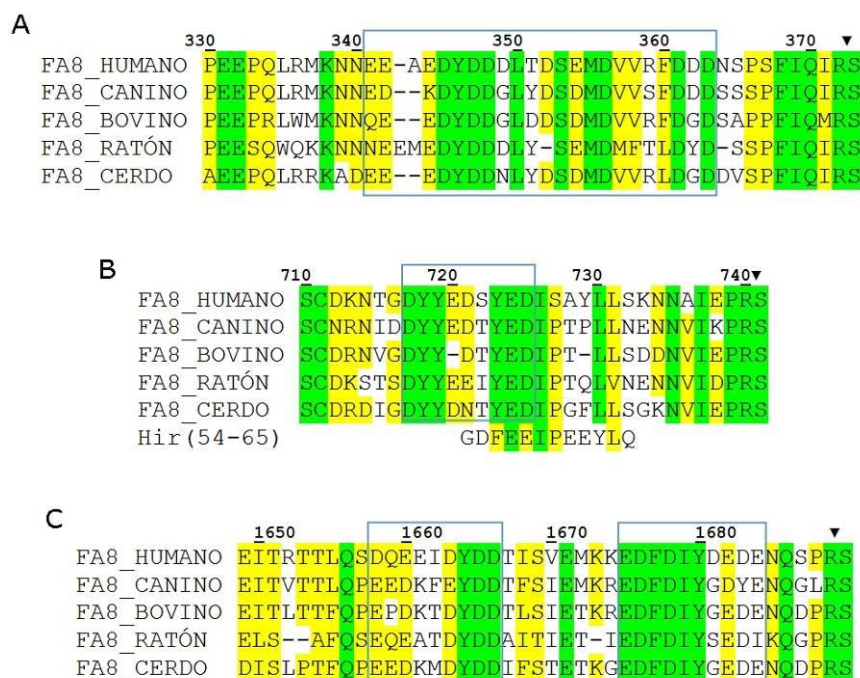
## 4.2 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA ACTIVACIÓN DEL FVIII Y DE PAR1

### 4.2.1 Expresión heteróloga de los conectores interdominios FVIIIa1 (330-372), FVIIIa2 (712-740) y FVIIIa3 (1649-1689)

Al iniciar la presente investigación, partimos de la hipótesis de que los interconectores de los dominios A1-A2, A2-B y B-A3 del factor VIII de la coagulación son importantes tanto para la activación del cofactor, como para la actividad del FVIII dentro del complejo tenasa (Ver epígrafe 1.3, Figura 1.2) [Corral-Rodríguez, Bock, *et al.*, 2011, Eaton, Rodríguez, *et al.*, 1986, Newell and Fay, 2007, Yuan, Walke, *et al.*, 2005, Saenko and Scandella, 1997]. Para poder realizar estudios estructurales de estos dominios aislados se sobreexpresaron y purificaron los



fragmentos recombinantes correspondientes al conector FVIIIa1 (residuos Pro<sup>330</sup>-Arg<sup>372</sup>) (Figura 4.9A), al FVIIIa2, que contiene los residuos Asp<sup>712</sup>-Arg<sup>740</sup> (Figura 4.9B) y al FVIIIa3 que incluye la región Glu<sup>1649</sup>-Arg<sup>1689</sup> (Figura 4.9C). Estos conectores preceden a los sitios de corte Arg<sup>372</sup>-Ser<sup>373</sup>, Arg<sup>740</sup>-Ser<sup>741</sup> y Arg<sup>1689</sup>-Ser<sup>1690</sup>, respectivamente.



**Figura 4.9 Alineamientos múltiples de los conectores interdominios del FVIII de diferentes especies de mamíferos.** Se presentan las secuencias de las regiones FVIIIa1 (A), FVIIIa2 (B) y FVIIIa3 (C). La numeración corresponde al FVIII humano maduro. Los residuos estrictamente conservados en cada uno de los conectores se muestran con fondo verde; otros residuos bien conservados o reemplazados conservativamente están sombreados en amarillo. Las regiones ricas en aminoácidos de carácter ácido o aromático se muestran dentro de un recuadro, y el sitio de corte por la trombina se indica con un triángulo invertido. En el panel B se presenta la secuencia del extremo C-terminal de la hirudina (Hir-C) debajo de las secuencias del conector FVIIIa2 topológicamente equivalentes. En C nótese que el conector FVIIIa3 presenta dos regiones diferenciadas ricas en aminoácidos de carácter ácido. Los alineamientos fueron generados con *T-Coffee* [Notredame, Higgins, *et al.*, 2000, Poirot, O'Toole, *et al.*, 2003].

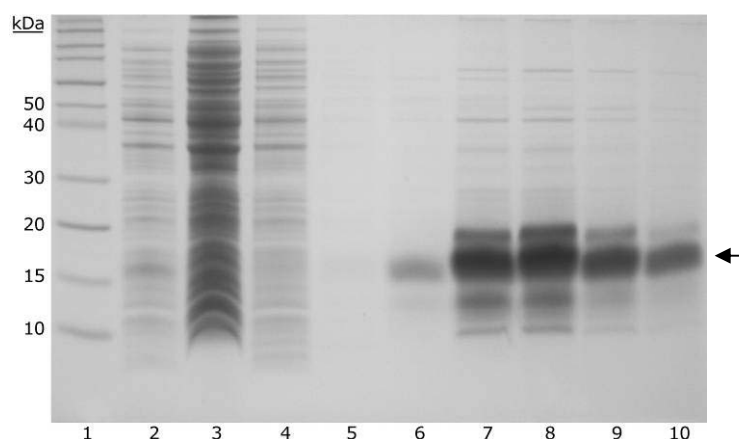
#### 4.2.1.1 Sobreexpresión del fragmento FVIIIa1

El vector de expresión para el fragmento FVIIIa1 (330-372), con el que se transformaron las diferentes cepas de *E. coli* BL21(DE3), fue construido según se indica en el epígrafe 3.3 de Materiales y Métodos. Los primeros experimentos de sobreexpresión del fragmento se realizaron en medio de cultivo LB con la cepa BL21(DE3) de *E. coli* a 37 °C, y se evaluaron los resultados después de la inducción a las 2, 4, 6, 8 y 12 h. Se comprobó que a tiempos superiores a las 6 horas de inducción no había un incremento proporcional en los niveles de sobreexpresión, y además se comenzaban a detectar productos de degradación del conector. También se realizaron experimentos de expresión en otras cepas *E. coli* derivadas de BL21 (DE3)

(BL21 pLysS y BL21 pLysS Star™) para determinar si con ellas aumentaba la cantidad del fragmento recombinante obtenido. Sin embargo, la sobreexpresión resultó ser similar en las tres cepas, y en todas ellas el fragmento se expresaba soluble (datos no mostrados). Consecuentemente, en los experimentos de sobreexpresión que se realizaron de forma rutinaria durante el transcurso de esta investigación, se trabajó con la cepa BL21(DE3) pLysS.

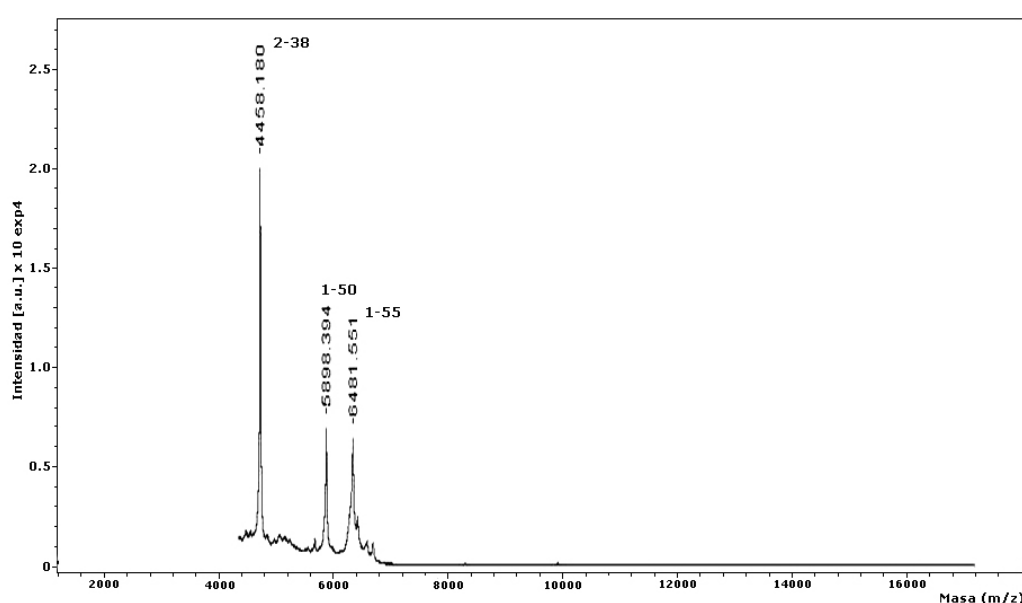
#### 4.2.1.2 Extracción y purificación del fragmento FVIIIa1

Una vez extraídas las proteínas solubles con B-PER, el sedimento obtenido tras la centrifugación se incubó en tampón Tris/NaCl conteniendo concentraciones crecientes de urea para solubilizar las proteínas insolubles y evaluar la posible existencia de fracciones insolubles del péptido. En consecuencia con el hecho de que el fragmento sobreexpresado es una cadena polipeptídica relativamente corta, carente de elementos de estructura secundaria, y con un notable carácter polar (45% de los residuos), se observó que el fragmento recombinante FVIIIa1 se encontraba mayoritariamente en la fracción soluble. Por tanto, durante las expresiones rutinarias del FVIIIa1, únicamente se trabajó con la fracción extraída en B-PER, omitiéndose las extracciones con urea. El fragmento FVIIIa1 recombinante, se purificó por cromatografía de afinidad por metal eluyendo de la resina de afinidad con 500 mM de imidazol con un considerable grado de pureza, como lo demuestra el análisis mediante SDS-PAGE (Figura 4.10).



**Figura 4.10 Análisis por SDS-PAGE de la expresión heteróloga y la purificación del conector FVIIIa1.** Se evaluaron los niveles de proteína expresados durante las 6 horas de inducción tras añadir 0.55 mM IPTG al cultivo bacteriano. Carril 1, marcador de peso molecular (*Novex Sharp*) cuyas bandas corresponden a 3.5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 110, 160 y 260 kDa. En el carril 2 se muestra una alícuota de las células totales; en el carril 3 se visualiza la fracción de proteínas no unidas a la resina de afinidad Ni-NTA; en los carriles 4 y 5 se presentan alícuotas de lavados sucesivos con 30 mM de imidazol; mientras que en los carriles del 6 al 10 se muestran las fracciones de eluciones sucesivas de la resina con 500 mM de imidazol en tampón Tris/NaCl, en las que se observa el fragmento recombinante de interés purificado (indicado con una flecha).

El rendimiento promedio de recuperación del fragmento recombinante FVIIIa1 fue de 0.5 mg de proteína a partir de 1 litro de cultivo bacteriano. El producto obtenido fue analizado de forma rutinaria por espectrometría de masas en modo negativo, identificando la presencia del fragmento FVIIIa1 y confirmando su pureza, al observar un pico de masa de 6481.55 Da. Estos análisis de espectrometría identificaron por tanto una forma recombinante que parece corresponder al fragmento recombinante del FVIIIa1 sulfatado o fosforilado, probablemente en la Tyr<sup>346</sup>. También se detectaron picos adicionales sin ésta modificación, correspondientes a fragmentos parciales del conector, que probablemente aparecen por la degradación causada al bombardear la muestra con el láser del espectrómetro (Figura 4.11).

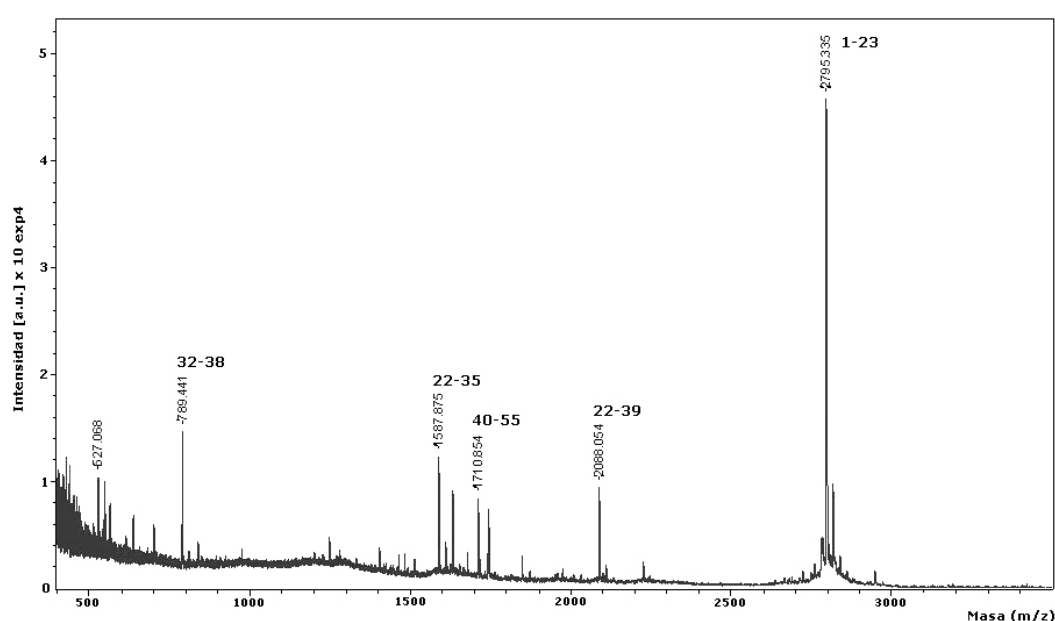


| Posición | Masa Teórica (Da) | Masa Experimental (Da) | Secuencia del fragmento recombinante                   |
|----------|-------------------|------------------------|--------------------------------------------------------|
| 1-55     | 6402.7583         | 6481.551               | ASHHHHHHPPEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNPSFIQIRGSGC |
| 1-50     | 5899.1487         | 5898.394               | ASHHHHHHPPEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNPSFIQIR     |
| 2-38     | 4458.6356         | 4458.180               | SHHHHHHPPEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVR                  |

**Figura 4.11 Verificación de la identidad del fragmento recombinante FVIIIa1.** Espectro de masas del fragmento recombinante FVIIIa1 purificado en el que se observa el pico correspondiente a la especie monocargada, con una relación masa/carga ( $m/z$ ) de 6481.55, que coincide con el peso molecular teórico del fragmento sulfatado en la Tyr<sup>346</sup> o fosforilado en alguno de sus residuos de serina, treonina o tirosina (ver Discusión). Aparecen también dos fragmentos de ruptura del FVIIIa1 que no incluyen esta modificación química. El espectro de masas se obtuvo en modo lineal con polaridad negativa. En la tabla se indica en *italica* los residuos que corresponden al constructo y se subraya el residuo Tyr<sup>346</sup> que se predice es sulfatado o fosforilado en la proteína natural, según la herramienta Sulfinator y NetPhos 2.0 de ExPASy (<http://web.expasy.org>). Las masas teóricas se calcularon con PeptideMass ([www.expasy.org/tools/peptide-mass.html](http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html)) ó con mMass 3.9.0 [Strohalm, Hassman, *et al.*, 2008].

#### 4.2.1.3 Comprobación de la secuencia del conector FVIIIa1 mediante digestión con endoproteinasa Asp-N.

La identidad del fragmento purificado se confirmó por espectrometría de masas (MS) de los fragmentos generados con la endoproteinasa Asp-N, según el procedimiento indicado en Materiales y Métodos. Las masas obtenidas se compararon a las masas teóricas según PeptideMass de ExPasy [Wilkins, Lindskog, *et al.*, 1997] ([www.expasy.org/tools/peptide-mass.html](http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html)) y con mMass 3.9.0 [Strohalm, Hassman, *et al.*, 2008]. Se comprobó la presencia de picos con relaciones  $m/z$  correspondientes a las masas teóricas de los fragmentos monocargados generados (Figura 4.12).

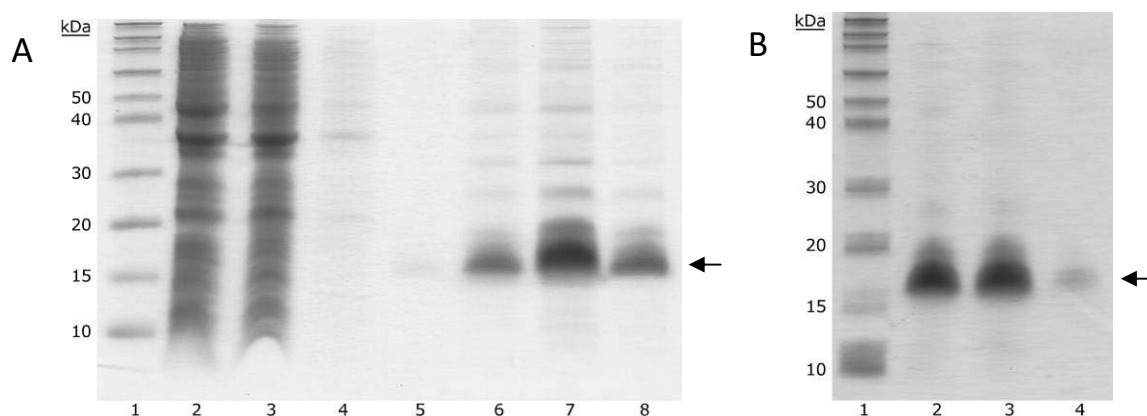


| Posición | Masa Teórica (Da) | Masa Experimental (Da) | Secuencia del fragmento recombinante |
|----------|-------------------|------------------------|--------------------------------------|
| 1-23     | 2795.9452         | 2795.335               | ASHHHHHHPPEPQLRMKNNEEAE              |
| 22-39    | 2088.8703         | 2088.054               | AEDYDDDLTDSEMDVVR                    |
| 40-55    | 1711.7889         | 1710.854               | DDDNPSFIQIRGSGC                      |
| 22-35    | 1587.5639         | 1587.875               | AEDYDDDLTDSEMD                       |
| 32-38    | 789.8923          | 789.441                | SEMDVVR*                             |

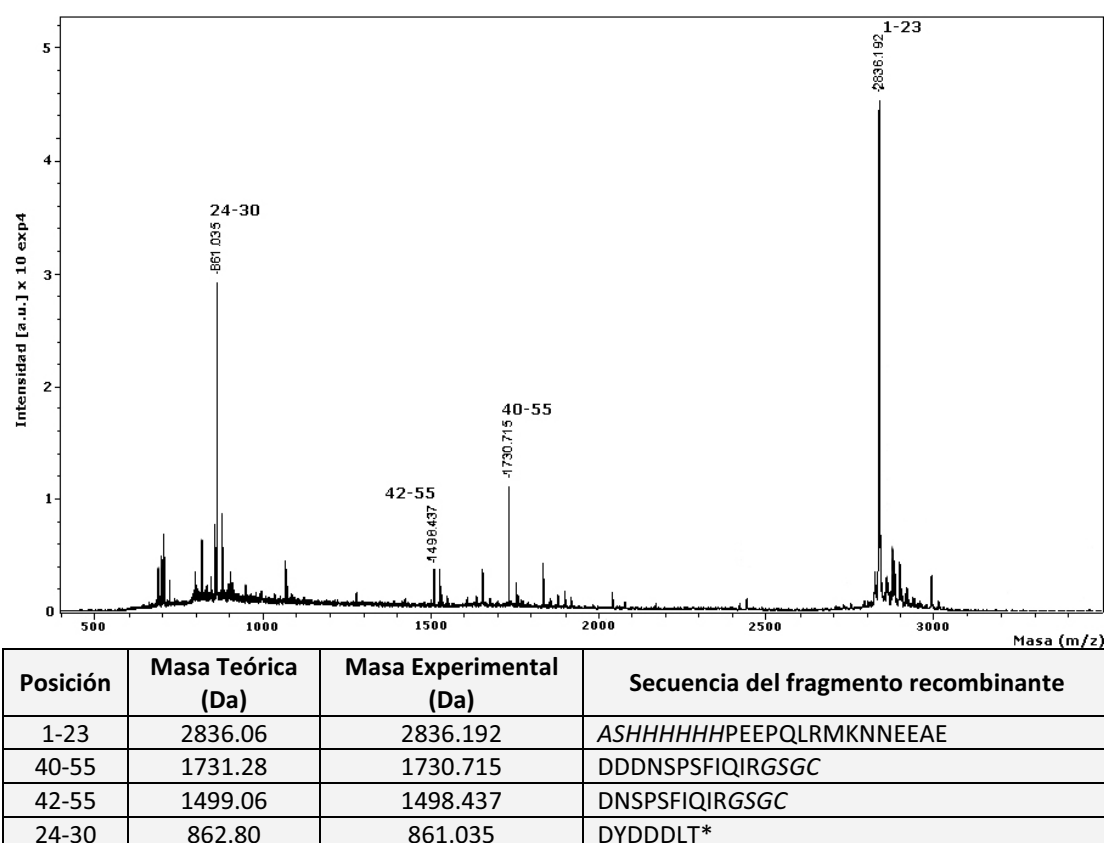
**Figura 4.12 Verificación de la identidad del fragmento FVIIIa1.** El fragmento recombinante FVIIIa1 purificado fue digerido con la endoproteinasa Asp-N y los péptidos resultantes analizados por espectrometría de masas en modo reflector con polaridad negativa. En el espectro mostrado se identifican los picos correspondientes a las masas que se indican en la tabla presentada debajo, donde aparecen las masas teóricas calculadas con PeptideMass ([www.expasy.org/tools/peptide-mass.html](http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html)) y con mMass 3.9.0 [Strohalm, Hassman, *et al.*, 2008]. Se verificó la secuencia completa del fragmento FVIIIa1 a partir de la posición 1 (Ala) hasta la 55 (Cys) del fragmento recombinante. Nótese que uno de los fragmentos (marcado con \*) parece corresponder al extremo C-terminal de la forma degradada minoritaria que también se observa en la figura 4.11.

#### 4.2.1.4 Sobreexpresión y purificación del conector FVIIIa1 para los estudios de resonancia magnética nuclear: marcaje con $^{15}\text{N}$ y $^{13}\text{C}$

Según el tipo de experimento de RMN a realizar se sobreexpresó el conector FVIIIa1 en medio de cultivo mínimo M9 suplementado con cloruro de amonio- $^{15}\text{N}$ , o suplementado adicionalmente con glucosa- $^{13}\text{C}$  para el doble marcaje del mismo (FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ ) (ver epígrafes 3.3.5.1 y 3.8.1 de Materiales y Métodos). Los resultados de la sobreexpresión y purificación del conector a1 marcado se confirmaron mediante análisis por SDS-PAGE y la espectrometría de masas (Figuras 4.13 y 4.14). Una vez purificadas las muestras se dializaron exhaustivamente contra 25 mM fosfato de sodio pH 6.0, 25 mM NaCl, 500  $\mu\text{M}$  EDTA y 5 mM TCEP antes de realizar los ensayos de RMN.



**Figura 4.13 Preparación del fragmento recombinante FVIIIa1 marcado con nitrógeno-15 para estudios de RMN.** El conector interdominios FVIIIa1 se sobreexpresó en medio mínimo M9 suplementado con  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ . **A.** Evaluación de la purificación del FVIIIa1- $^{15}\text{N}$  a partir de la fracción soluble extraída con B-PER. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: alícuota de células totales, carril 3: proteínas no unidas a la matriz, carriles 4 y 5: lavados sucesivos con 30 mM de imidazol, carriles 6-8: eluciones con 500 mM de imidazol en tampón Tris/NaCl. **B.** Las muestras dializadas exhaustivamente se evaluaron nuevamente mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas, antes de realizar los ensayos de RMN.

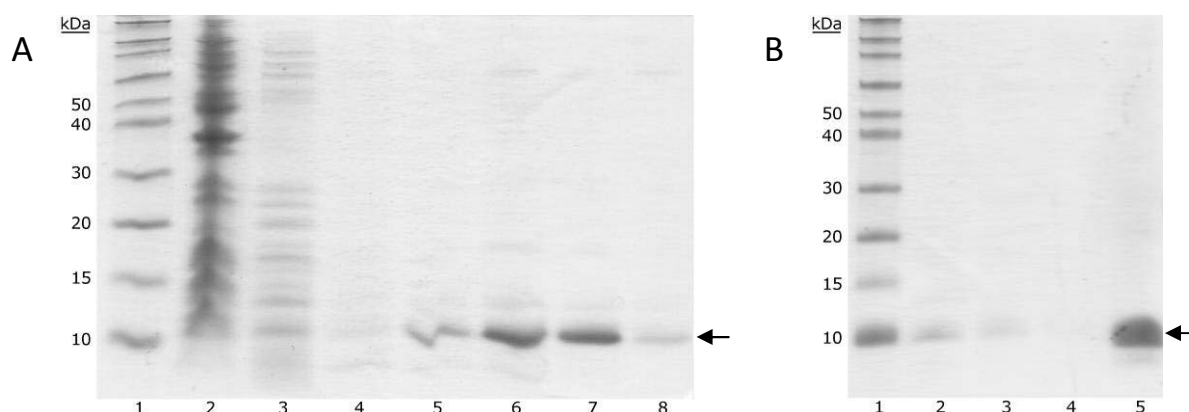


**Figura 4.14 Verificación de la identidad del fragmento FVIIIa1-<sup>15</sup>N a emplear en los ensayos de RMN.** El fragmento recombinante FVIIIa1-<sup>15</sup>N purificado fue digerido con la endoproteinasa Asp-N y los péptidos resultantes analizados por espectrometría de masas en modo reflector con polaridad negativa. En el espectro mostrado se identifican los picos correspondientes a las masas que se indican en la tabla presentada debajo, donde aparecen también las masas teóricas calculadas con PeptideMass ([www.expasy.org/tools/peptide-mass.html](http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html)) ó con mMass 3.9.0. Nótese las diferencias en masas con los péptidos equivalentes de la forma expresada en medio LB. La diferencia con la masa teórica, en el péptido indicado con el símbolo \*, se explica por la no incorporación de uno o dos átomos de <sup>15</sup>N en este péptido. Se resalta en *italica* los residuos que corresponden al constructo.

#### 4.2.1.5 Expresión recombinante del fragmento FVIIIa2

En base a los resultados obtenidos con el conector a1, se procedió a la expresión de los fragmentos equivalentes FVIIIa2 y FVIIIa3, siguiendo un protocolo semejante al desarrollado para producir el conector entre los dominios A1 y A2. En ensayos preliminares se expresó el fragmento FVIIIa2 en diferentes cepas de *E. coli* (BL21(DE3), BL21 pLysS y BL21 pLysS Star) y a temperaturas de 28, 30, 34 y 37 °C durante 6 horas de inducción tras añadir 0.55 mM de IPTG al medio de cultivo LB. Los mejores resultados se obtuvieron con la cepa BL21(DE3) al inducir a 30 °C durante 6 horas. Sin embargo, al extraer el fragmento del FVIIIa2 con el tampón de lisis (B-PER suplementado con 1mM PMSF, 1 mM de β-mercaptoetanol y 10 µg/ml de ADNasa I) la mayor parte del mismo se encontró en la fracción insoluble. El sedimento obtenido tras la centrifugación se incubó en tampón Tris/NaCl conteniendo concentraciones crecientes de urea

(2, 4, 6 y 8 M). Al analizar las fracciones correspondientes por SDS-PAGE se observó que el fragmento de interés se extraía mayoritariamente en 4 y 6 M de urea (Figura 4.15A).



**Figura 4.15 Análisis de la expresión y purificación en *batch* de las fracciones correspondientes a la sobreexpresión del conector FVIIIa2.** Se evaluaron los niveles de proteína expresados durante las 6 horas de inducción tras añadir 0.55 mM IPTG al cultivo de expresión. **A.** Se observa que el fragmento FVIIIa2 se extrae principalmente en las fracciones de 4 y 6 M de urea. En el carril 1: marcador de peso molecular, en el carril 2: alícuota de células totales, carriles 3 y 4 alícuotas de extracciones consecutivas en tampón B-PER, carriles del 5 al 8: alícuotas de las extracciones consecutivas con disoluciones de 2, 4, 6 y 8 M de urea. **B.** Se analizó la purificación de la fracción de FVIIIa2 extraída en urea. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: alícuota de la fracción de proteínas no unidas a la resina de afinidad Ni-NTA. En los carriles 3 y 4 se presentan alícuotas de lavados sucesivos con 30 mM de imidazol, y en el carril 5 se muestra la fracción de elución de la resina con 500 mM de imidazol en tampón Tris/NaCl/2 M urea, en la que se observa el fragmento recombinante de interés.

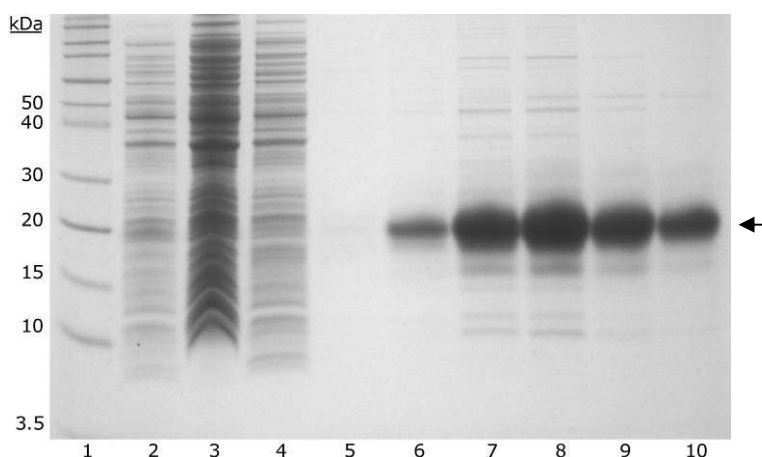
#### 4.2.1.6 Purificación del fragmento FVIIIa2

Para la purificación del fragmento recombinante FVIIIa2 se unificaron en un tubo Falcon (15 mL) las extracciones realizadas con las disoluciones de 2, 4 y 6 M de urea y se purificó la proteína mediante cromatografía de afinidad en *batch* utilizando Ni-NTA agarosa (ver Materiales y Métodos). La muestra final del fragmento FVIIIa2 se almacenó en tampón Tris/NaCl con 2 M de urea, para evitar la precipitación del mismo. Las fracciones correspondientes al proceso de purificación se evaluaron en geles de poliacrilamida al 12% (Figura 4.15B).

El rendimiento promedio de recuperación del conector FVIIIa2 fue de ~0.2 mg de proteína a partir de 1 litro de cultivo bacteriano, y las muestras se debieron de mantener en tampón Tris/NaCl con 2 M de urea, lo que representa una desventaja para los ensayos posteriores en los que se requiere trabajar con el conector en su estado nativo, principalmente para ensayos de cristalización.

#### 4.2.1.7 Sobreexpresión y purificación del fragmento FVIIIa3

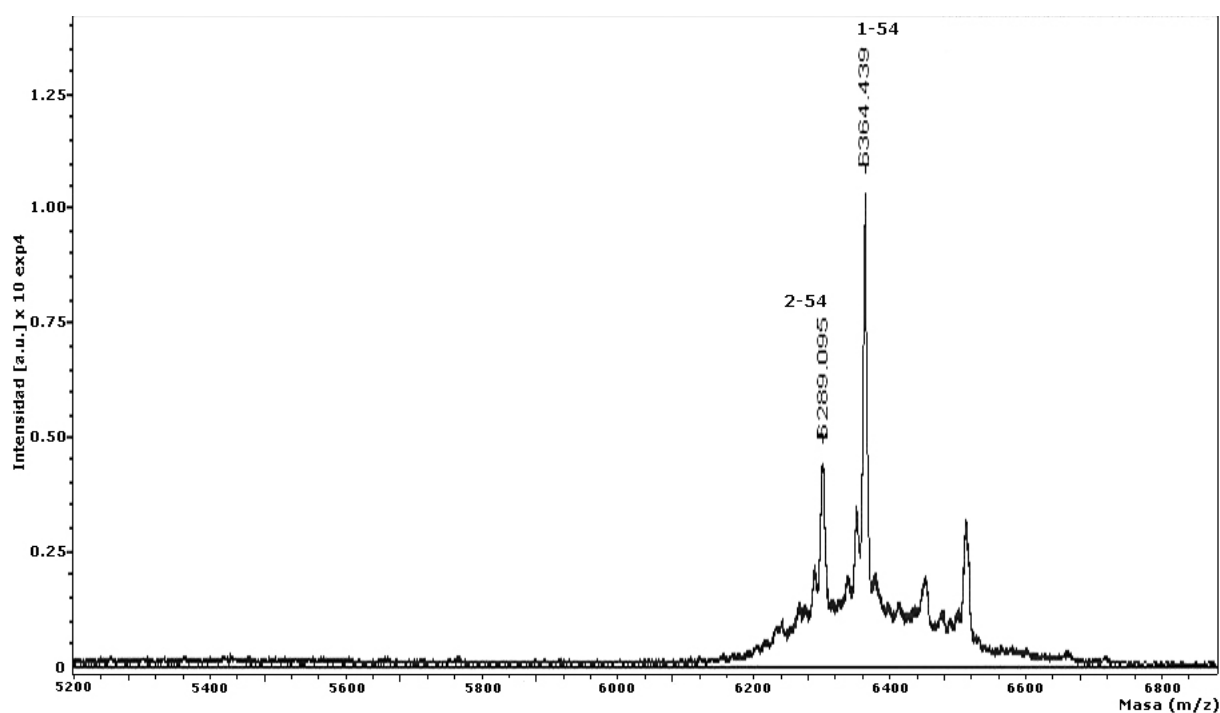
El fragmento equivalente a la región a3 que conecta los dominios B y A3 del FVIII se sobreexpresó y purificó siguiendo un protocolo semejante a los anteriores. La expresión en *E. coli* BL21 (DE3) pLysS a 37 °C durante 6 horas dio resultados similares a los obtenidos para el FVIIIa1. El *pellet* bacteriano se descongeló directamente en el tampón de lisis (B-PER suplementado con 1 mM PMSF, 1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol y 10  $\mu$ g/mL de ADNasa I), obteniéndose la mayoría del fragmento recombinante en la fracción soluble y purificándose por cromatografía de afinidad por  $\text{Ni}^{2+}$  (ver Figura 4.16).



**Figura 4.16 Sobreexpresión y purificación del fragmento recombinante FVIIIa3.** Comprobación por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida (12%) de las fracciones correspondientes a la purificación del conector a3 del FVIII. En el carril 1: marcador de peso molecular, *Novex Sharp* (el peso correspondiente a las bandas se indica a la izquierda del gel, en kilodaltons). En el carril 2 se muestra una alícuota de las células totales; en el carril 3 se visualiza la fracción de proteínas no unidas a la resina de afinidad Ni-NTA; en los carriles 4 y 5 se presentan alícuotas de lavados sucesivos con 30 mM de imidazol; mientras que en los carriles del 6 al 10 se muestran las fracciones de eluciones sucesivas de la resina con 500 mM de imidazol en tampón Tris/NaCl, en las cuales se observa el fragmento recombinante FVIIIa3 purificado (indicado con una flecha).

El rendimiento promedio de recuperación del conector FVIIIa3 fue de 0.4 mg de proteína a partir de 1 litro de cultivo bacteriano. Análisis rutinarios por espectrometría de masas permitieron verificar la identidad del fragmento y su pureza (Figura 4.17). La especie monocargada con relación  $m/z$  6364.44 Da identificada en estos análisis corresponde a la secuencia del fragmento recombinante; la diferencia de masa con relación a la teórica ( $\sim 80$  Da) sugiere bien la sulfatación de la Tyr<sup>1664</sup> o la fosforilación de alguno de los residuos de serina, treonina o tirosina (ver Discusión).



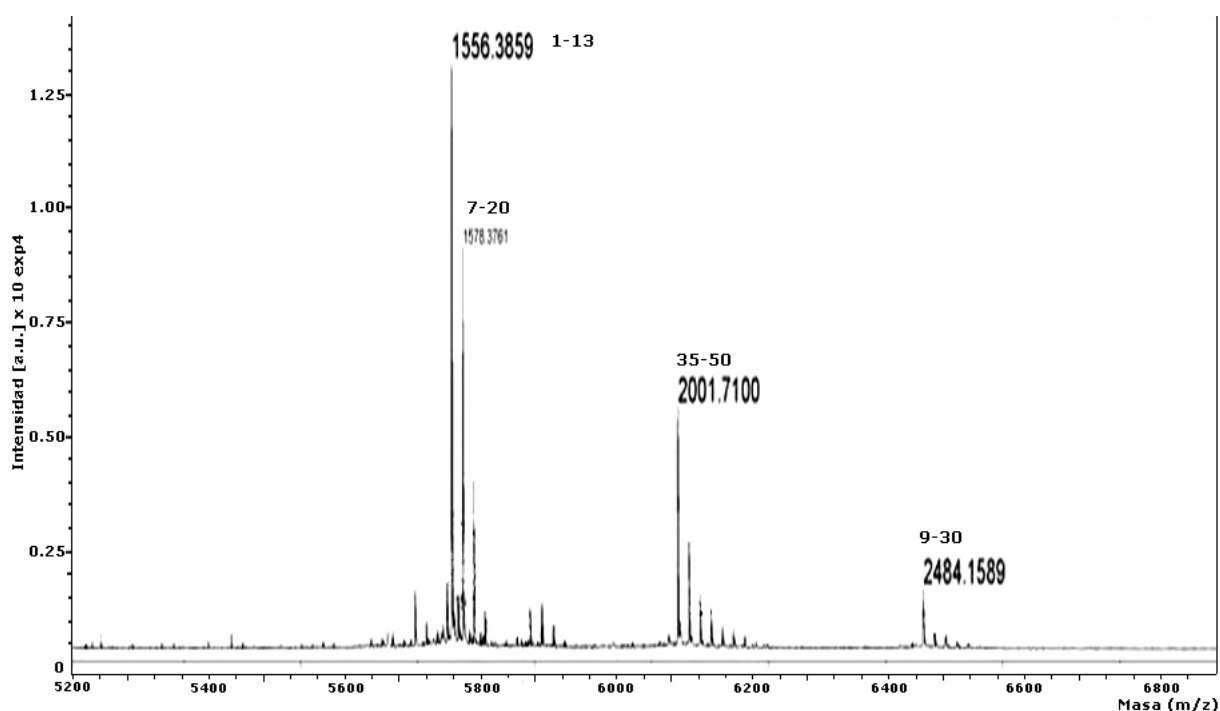


| Posición | Masa Teórica (Da) | Masa Experimental (Da) | Secuencia del fragmento recombinante                         |
|----------|-------------------|------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 1-54     | 6284.5350         | 6364.439               | <i>ASHHHHHHGEITRTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRGSGC</i> |
| 2-54     | 6209.6900         | 6289.095               | <i>SHHHHHHGEITRTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRGSGC</i>  |

**Figura 4.17 Verificación de la identidad del fragmento FVIIIa3.** Espectro de masas obtenido de la fracción del fragmento recombinante FVIIIa3 purificado, en el que se observa el pico correspondiente a la especie monocargada, con una relación  $m/z$  de 6364.44, que coincide con el peso molecular teórico del fragmento con la adición de ~80 Da debidos a una sulfatación o fosforilación. También aparece un pico minoritario que corresponde a la  $m/z$  del fragmento FVIIIa3 sin el residuo de alanina N-terminal, eliminado probablemente por aminopeptidasas bacterianas. El espectro de masas se obtuvo en modo lineal con polaridad negativa. Se subraya la Tyr<sup>1664</sup>, el sitio más probable de una sulfatación o fosforilación en la proteína natural, según la herramienta Sulfinator y NetPhos 2.0 de ExPASy (<http://web.expasy.org/>). Se indica en *italica* los residuos que corresponden al constructo.

#### 4.2.1.8 Comprobación de la secuencia del fragmento FVIIIa3 mediante espectrometría de masas

La identidad del fragmento purificado se confirmó analizando mediante espectrometría de masas (MS) los fragmentos trípticos generados según el procedimiento indicado en Materiales y Métodos. Las masas obtenidas se compararon a las masas teóricas calculadas con PeptideMass [Wilkins, Lindskog, *et al.*, 1997] (<http://expasy.org/tools/peptide-mass.html>) y con mMass 3.9.0 [Strohalm, Hassman, *et al.*, 2008]. Se comprobó la presencia de picos con relaciones  $m/z$  correspondientes a las masas teóricas de los fragmentos monocargados generados (ver Figura 4.18).



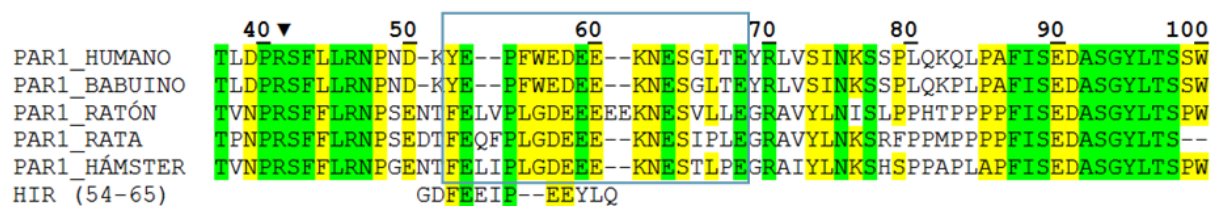
| Posición | Masa Teórica (Da) | Masa Experimental (Da) | Secuencia del fragmento recombinante |
|----------|-------------------|------------------------|--------------------------------------|
| 9-30     | 2484.5634         | 2484.1589              | GEITRTTLQSDQEEIDYDDTIS               |
| 35-50    | 2001.0055         | 2001.7100              | KEDFDIYDEDENQSPR                     |
| 7-20     | 1577.6804         | 1578.3761              | HHGEITRTTLQSDQ                       |
| 1-13     | 1556.6298         | 1556.3859              | ASHHHHHHGEITR                        |

**Figura 4.18 Verificación de la identidad del fragmento recombinante FVIIIa3.** La proteína recombinante purificada fue digerida con tripsina, y los péptidos resultantes analizados por espectrometría de masas en modo reflector con polaridad positiva. En el espectro mostrado se identifican los picos correspondientes a las masas que se indican en la tabla presentada debajo, donde aparecen las masas teóricas calculadas con PeptideMass ([www.expasy.org/tools/peptide-mass.html](http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html)) y con mMass 3.9.0.

#### 4.2.2 Expresión heteróloga de las variantes del dominio extracelular de PAR1, PAR1<sub>L</sub> (37-102) y PAR1<sub>S</sub> (42-102)

El receptor activado por proteasa-1 (PAR1) es un receptor plaquetario muy importante en el proceso de coagulación, y es activado por la trombina tras cortar el enlace Arg<sup>41</sup>-Ser<sup>42</sup> en el dominio extracelular N-terminal (ver epígrafe 1.6), exponiendo un nuevo extremo N-terminal que interactúa con el resto de los lazos extracelulares del receptor. En la figura 4.19 se presentan alineamientos parciales de la secuencia del ectodominio de PAR1 de varias especies de mamíferos. Para comprender las bases moleculares de la activación de PAR1 mediada por la trombina se expresaron de forma recombinante dos variantes del dominio extracelular de PAR1, una variante que incluye los residuos Ser<sup>42</sup>-Thr<sup>102</sup> y que corresponde al fragmento del receptor luego del corte de activación (PAR1 *Short*, PAR1<sub>S</sub>), y una segunda variante extendida

N-terminalmente hasta el residuo Thr<sup>37</sup>, y que por lo tanto incluye los residuos P<sub>5</sub>-P<sub>1</sub> esenciales para la formación del complejo productivo trombina-sustrato (PAR1<sub>Long</sub>, PAR1<sub>L</sub>).



**Figura 4.19 Alineamientos múltiples del dominio extracelular de PAR1 de diferentes especies de mamíferos.** La numeración corresponde al PAR1 humano. Los residuos estrictamente conservados se muestran con fondo verde; otros residuos bien conservados o reemplazados conservativamente están sombreados en amarillo. La región rica en aminoácidos de carácter ácido o aromático se muestra dentro de un recuadro; cabe destacar que esta región presenta cierto grado de homología con la región C-terminal de la hirudina, Gly<sup>54</sup>-Qln<sup>65</sup>, que es la región del inhibidor que interacciona específicamente con el exosito I de la trombina (ver epígrafe 1.7.3.1). La secuencia del extremo C-terminal de la hirudina se presenta debajo de las secuencias del dominio extracelular de PAR1 topológicamente equivalentes. El sitio de corte por la trombina se indica con un triángulo invertido. Los alineamientos fueron generados con T-Coffee [Notredame, Higgins, *et al.*, 2000, Poirot, O'Toole, *et al.*, 2003].

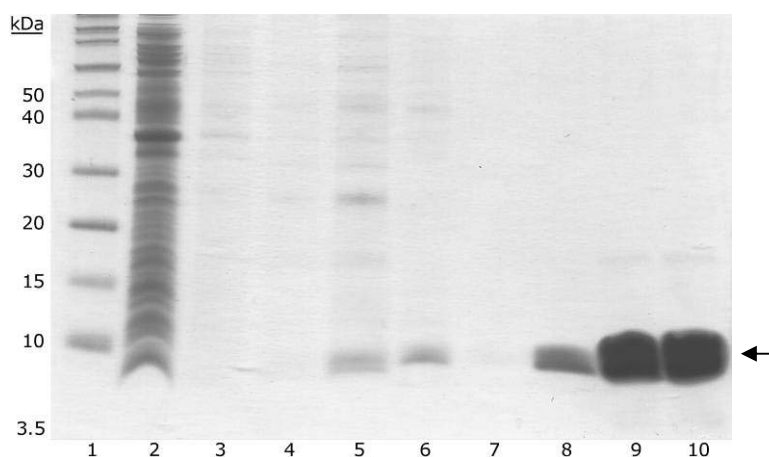
#### 4.2.2.1 Sobreexpresión y extracción de la variante PAR1 (37-102) del dominio extracelular de PAR1

Los vectores de expresión para las variantes del dominio extracelular de PAR1, PAR1<sub>L</sub> (37-102) y PAR1<sub>S</sub> (42-102) fueron construidos según se indica en el epígrafe 3.3 de Materiales y Métodos. En experimentos preliminares, se sobreexpresó la variante PAR1<sub>L</sub> en las cepas de *E. coli* BL21(DE3), BL21 pLysS y BL21 pLysS Star, a una temperatura de 37 °C durante 6 horas. Al analizar los resultados mediante geles de poliacrilamida al 12%, se observó que las cepas de *E. coli* BL21(DE3) eran las que ofrecían mayores niveles de sobreexpresión. Sin embargo, al analizar las extracciones realizadas de forma similar a lo indicado en el epígrafe 4.2.1.2, sólo una parte minoritaria de la proteína recombinante aparecía en la fracción soluble. Por tanto, en experimentos posteriores se utilizó la cepa BL21(DE3) y se indujo la expresión a 30 °C durante 6 horas, lo que permitió incrementar la proporción del dominio extracelular en la fracción soluble.

Una vez extraídas las proteínas solubles en el tampón B-PER, el sedimento obtenido tras la centrifugación se incubó en tampón Tris/NaCl conteniendo concentraciones crecientes de urea (2, 4, 6 y 8 M). El fragmento PAR1<sub>L</sub> se recuperó mayoritariamente en la extracción realizada con 2 M de urea (Figura 4.20).

#### 4.2.2.2 Purificación de la variante PAR1 (37-102)

La purificación del dominio extracelular PAR1<sub>L</sub> se realizó, de forma similar a la empleada para los conectores interdominios del FVIII, mediante cromatografía de afinidad en *batch* utilizando Ni-NTA acoplado a agarosa (ver Materiales y Métodos). En el caso de las variantes del dominio extracelular PAR1<sub>L</sub> y PAR1<sub>S</sub> la cola de residuos de histidina (6xHis), utilizada para la purificación de estos fragmentos, se incluyó en sus extremos C-terminales para reducir posibles interferencias, por ejemplo con el sitio de corte Arg<sup>41</sup>-Ser<sup>42</sup> de trombina ubicado en el extremo N-terminal de PAR1<sub>L</sub>. Las fracciones correspondientes a la purificación a partir de la fracción soluble en B-PER y la fracción soluble en 2 M de urea, del dominio extracelular de PAR1<sub>L</sub>, se evaluaron en geles de poliacrilamida al 12% (Figura 4.20), revelando que el fragmento se obtenía con un considerable grado de pureza a partir de esta última fracción.



**Figura 4.20 Sobreexpresión y purificación del dominio extracelular del receptor PAR1<sub>L</sub> humano.** Se muestran los resultados de la purificación a partir tanto de la fracción de B-PER como de la de 2 M de urea. Carril 1: marcador de peso molecular, carriles del 2 al 5: alícuotas del proceso de purificación de la fracción soluble en B-PER (proteínas no unidas, lavado con 30 mM imidazol, y dos eluciones consecutivas con 500 mM de imidazol en tampón Tris/NaCl), carriles del 6 al 10: alícuotas de la purificación de la fracción en 2 M de urea (proteínas no unidas, lavado con 30 mM imidazol, y tres eluciones consecutivas con 500 mM de imidazol en tampón Tris/NaCl). Se indica el fragmento PAR1<sub>L</sub> purificado con una flecha.

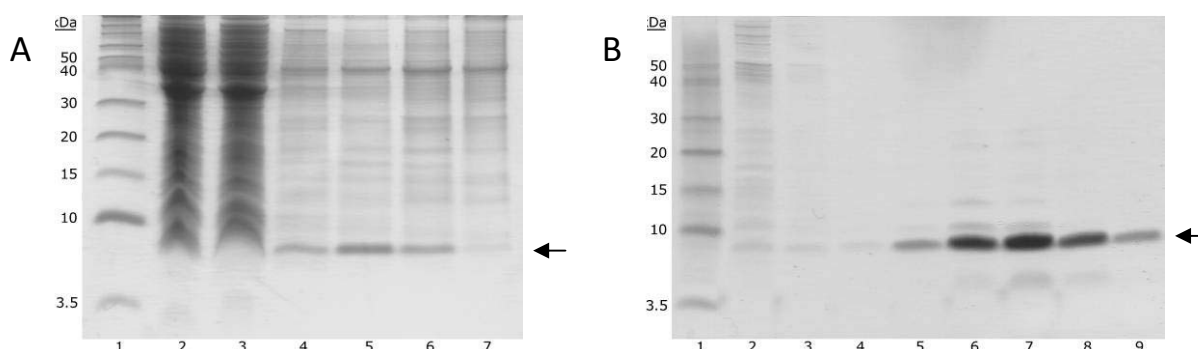
El rendimiento promedio del proceso fue de 0.6 mg de proteína recombinante a partir de 1 litro de cultivo bacteriano. Para comprobar la identidad del fragmento se realizaron análisis rutinarios por espectrometría de masas que confirmaron la identidad al detectar un pico correspondiente a una relación m/z de 8477.6 Da (masa teórica: 8476.3 Da).

#### 4.2.2.3 Sobreexpresión y purificación de la variante PAR1 (42-102) del dominio extracelular de PAR1

La variante PAR1<sub>S</sub> se sobreexpresó en las cepas de *E. coli* BL21(DE3), BL21 pLysS y BL21 pLysS Star. Al igual que la variante extendida, los mayores niveles de sobreexpresión de PAR1<sub>S</sub>

se obtuvieron en la cepa BL21(DE3) a 30°C durante 6 horas. Sin embargo, también en este caso la mayor parte del fragmento recombinante no es soluble en B-PER. Por ello, el *pellet* de la fracción insoluble obtenido, tras centrifugación, se incubó en tampón Tris/NaCl conteniendo concentraciones crecientes de urea (2, 4, 6 y 8 M). El análisis mediante SDS-PAGE reveló que el fragmento PAR1<sub>s</sub> se obtenía principalmente en las fracciones de 4 y 6 M de urea (Figura 4.21A).

Se unificaron las fracciones del fragmento recombinante PAR1<sub>s</sub> extraídas en 2, 4 y 6 M de urea y se purificaron mediante cromatografía de afinidad en *batch* utilizando Ni-NTA acoplado a agarosa (ver Materiales y Métodos). La muestra final del fragmento PAR1<sub>s</sub> se almacenó en tampón Tris/NaCl con 2 M de urea. Las fracciones correspondientes al proceso de purificación se evaluaron de forma rutinaria en geles de poliacrilamida, como se muestra en la figura 4.21B.



**Figura 4.21 Análisis de la expresión y purificación del fragmento del dominio extracelular PAR1<sub>s</sub>.** **A.** Niveles de proteína expresados tras 6 horas de inducción con 0.55 mM IPTG. En el carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: alícuota de células totales, carriles 3: alícuota de la extracción en tampón B-PER, carriles del 4 al 7: alícuotas de las extracciones consecutivas con disoluciones conteniendo 2, 4, 6 y 8 M de urea. Se observa que el fragmento PAR1<sub>s</sub> se extrae en las fracciones de 2, 4 y 6 M de urea. **B.** Las extracciones de PAR1<sub>s</sub> con las disoluciones de 2, 4 y 6 M de urea se juntaron y posteriormente se incubaron con la matriz de afinidad Ni-NTA agarosa. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: alícuota de la fracción de proteínas no unidas; carriles 3 y 4: alícuotas de lavados sucesivos con 30 mM de imidazol, carriles del 5 al 9: eluciones sucesivas de la resina con 500 mM de imidazol en tampón Tris/NaCl/2M urea, en la que se observa el fragmento recombinante de interés purificado.

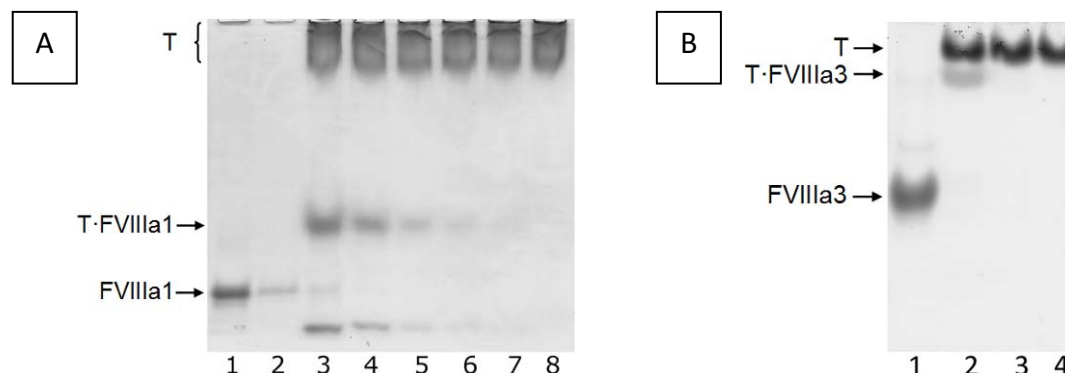
El rendimiento promedio de la purificación del dominio extracelular PAR1<sub>s</sub> fue bajo, ~0.150 mg de proteína a partir de 1 litro de cultivo bacteriano, y las muestras se debieron de mantener en tampón Tris/NaCl con 2 M de urea, lo que representa una desventaja para los ensayos posteriores en los que se requiere trabajar con el fragmento recombinante en su estado nativo, principalmente para ensayos de cristalización.

#### 4.2.3 Estudios preliminares de la formación de complejos trombina-sustrato mediante experimentos de desplazamiento de banda (*band shift*)

La electroforesis en condiciones no desnaturalizantes o nativas (que es llamada simplícidamente “en geles nativos”) se emplea comúnmente para detectar complejos de ADN-proteína, ya que la carga negativa del ADN impone un desplazamiento de estos complejos hacia el ánodo, compensando con creces su mayor masa con relación a la proteína libre. Esta técnica ha sido usada también de forma rutinaria en nuestro grupo para la detección de complejos de la trombina con inhibidores proteicos derivados de organismos hematófagos, todos los cuales poseen puntos isoeléctricos muy bajos (ver por ejemplo [Macedo-Ribeiro, Almeida, *et al.*, 2008] y el epígrafe 1.7.3.2 en la Introducción). En el presente trabajo, se ha empleado la técnica para revelar la formación de complejos entre la trombina y los conectores FVIIIa1 y FVIIIa3, así como con el dominio extracelular del receptor PAR1, partiendo de la observación que estos polipéptidos poseen una carga negativa neta a pH neutro-básico que hará que el complejo trombina-sustrato tienda a migrar más rápidamente hacia el ánodo que las moléculas de proteasa libre cuando se someten a una electroforesis en geles nativos.

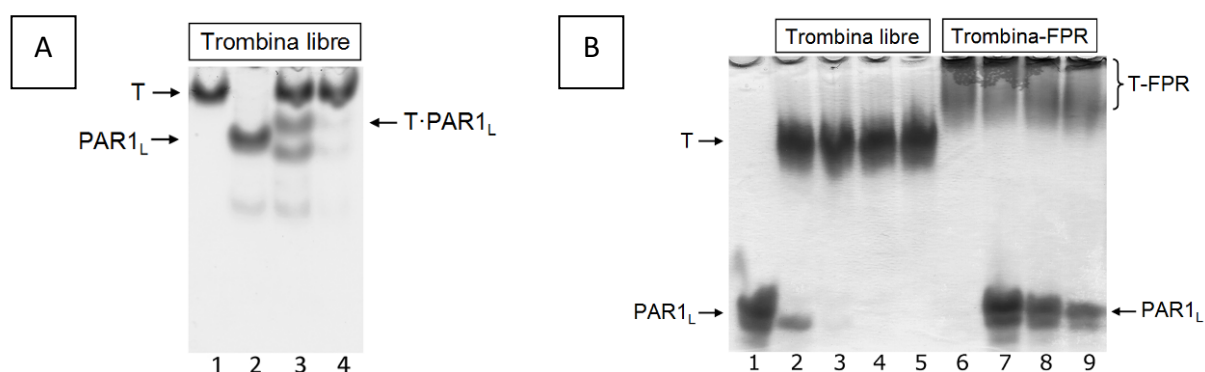
La formación de los complejos FVIIIa1-trombina libre y FVIIIa3-trombina libre se detectó mediante electroforesis en condiciones nativas en geles de poliacrilamida Tris-glicina (pH 8.5) o de HEPES-imidazol (pH 7.4) (ver Materiales y Métodos). En ambos casos se utilizaron geles con una fase apiladora para conseguir una mejor separación de las bandas correspondientes al complejo y a los componentes aislados, obteniéndose mejores resultados con los geles de Tris-glicina. El punto isoeléctrico (pI) de la trombina se encuentra entre 7.0-7.6 [Lundblad R.L., 1977], mientras que el pI calculado de los conectores del FVIII (Tabla 3.1 de Materiales y Métodos) es de alrededor de 4.5, por lo que al aplicar la diferencia de potencial durante un determinado periodo de tiempo, deberían observarse diferencias en las distancias migradas por las bandas correspondientes a la trombina sola y a sus complejos. Como se puede comprobar en la Figura 4.22, mediante este procedimiento se logró demostrar de manera cualitativa la formación de complejos estables entre la trombina y los fragmentos FVIIIa1 y FVIIIa3. Al mismo tiempo, en el caso del FVIIIa1 se observa la aparición de una banda adicional que migra más rápidamente en el gel (Figura 4.22A), y que parece resultar de un corte en el residuo Arg<sup>336</sup> del conector por parte de la trombina. Cabe mencionar que este resultado es similar al obtenido con el conector a3 del factor V en estudios previos realizados por nuestro grupo (datos sin

publicar), pero el posible significado (pato)fisiológico de estas observaciones permanece por explorar.



**Figura 4.22 Demostración de la formación de los complejos trombina-FVIIIa1 y trombina-FVIIIa3 mediante experimentos de *band-shift*.** Se emplearon geles al 10% de acrilamida nativos preparados con Tris-Glicina, pH 8.5. **A.** En los carriles 1 y 2 se cargaron 10 y 3 µg del conector FVIIIa1, en el carril 8, 10 µg de trombina, y en los carriles del 3-7 se aplicaron diferentes proporciones molares del fragmento recombinante respecto a la trombina (10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 0.5:1, respectivamente). Se observa la aparición de una nueva banda que parece corresponder al complejo trombina-FVIIIa1. **B.** En el carril 1 se cargaron 10 µg del conector FVIIIa3, en los carriles 2 y 3: proporciones molares de 5:1 y 1:1 del FVIIIa3: trombina y en el carril 4, 10 µg de trombina. Nótese la presencia de una banda que migra entre las correspondientes a la trombina y al FVIIIa3 en el carril 2, y que por tanto parece corresponder al complejo trombina-FVIIIa3.

En el caso del fragmento del dominio extracelular de PAR1 ( $pI = 5.78$ ) se estudió la formación de complejos con trombina libre y con trombina-FPR mediante electroforesis en condiciones nativas en geles de poliacrilamida Tris-glicina (pH 8.5). Debido a la limitada resolución de los geles de poliacrilamida nativos, y/o porque el efecto de la carga negativa extra aportada por el dominio de PAR1 queda totalmente compensado por la mayor masa del complejo trombina-PAR1<sub>L</sub>, no se pudieron visualizar de forma reproducible cambios significativos en la distancia migrada por la trombina (libre o inhibida con FPR) en presencia o ausencia del dominio recombinante. En la figura 4.23A se presenta evidencia directa de la generación del complejo entre la trombina libre y el fragmento PAR1<sub>L</sub>. Incluso en los casos en que no fue posible detectar una banda correspondiente al complejo trombina-PAR1<sub>L</sub>, cambios notables en la intensidad de las bandas asociados con el fragmento de PAR1 sugieren que este es capaz de formar un complejo estable con la trombina libre, pero no -o al menos no tan eficientemente- con la proteasa inhibida irreversiblemente (comparar carriles 2-4 y 7-9 en la figura 4.23B).



**Figura 4.23 Demostración de la formación del complejo trombina-PAR1 mediante experimentos de *band-shift*.**

Se emplearon geles al 10% de acrilamida nativos preparados con Tris-Glicina, pH 8.5. **A.** En el carril 1 se cargaron 10 μg de trombina, en el carril 2, 10 μg de PAR1<sub>L</sub> y en los carriles 3 y 4 proporciones molares de 5:1 y 1:1 de PAR1<sub>L</sub>: trombina. Se observa la aparición de una nueva banda que parece corresponder al complejo trombina-PAR1<sub>L</sub>. **B.** En el carril 1 se cargaron 5 μg de PAR1<sub>L</sub>, en los carriles 5 y 6 se cargó esa misma cantidad de trombina libre y de trombina inhibida con FPR, respectivamente. En los carriles 2-4 se aplicaron diferentes proporciones molares de PAR1<sub>L</sub> respecto a trombina libre (5:1, 2:1 y 1:1, respectivamente), y en los carriles 7-9 se aplicaron las mismas proporciones molares, pero con respecto a trombina-FPR. Se observa una reducción significativa en la intensidad de las bandas correspondientes al fragmento de PAR1<sub>L</sub> en los carriles 2-4, lo que sugiere la formación del complejo con la trombina libre. En contraposición, no se observa esta reducción en los carriles 7-9, indicando la no formación de complejo con trombina-FPR.

#### 4.2.4 Búsqueda de condiciones de cristalización de complejos entre la trombina y los conectores del FVIII y el dominio extracelular de PAR1

Las estructuras de cristales del conector FVa2 resueltas previamente por nuestro grupo [Corral-Rodriguez, Bock, *et al.*, 2011] y los resultados de los experimentos de *band shift* y resonancia magnética nuclear obtenidos en esta investigación, que confirman la interacción de los conectores a1 y a3 del FVIII, y de la variante del dominio extracelular de PAR1 con la trombina, estimularon la búsqueda de condiciones de cristalización de los complejos correspondientes. A lo largo de este proyecto, se prepararon en repetidas ocasiones los complejos que se indican en la tabla 4.12 con el objetivo de identificar condiciones de cristalización en las que queden “atrapados” dichos complejos proteicos. En todos los casos, los complejos se prepararon con un exceso molar del fragmento recombinante del sustrato en relación a la trombina de entre 2:1 y 15:1, tal y como se indicó en el epígrafe 3.7.1 de Materiales y Métodos, para favorecer la forma acomplejada de la trombina sobre la proteasa libre.

La búsqueda de las condiciones de cristalización de los complejos con los diferentes kits de cristalización se realizó manualmente como se indica en el epígrafe 3.7.2 de Materiales y Métodos. Todos los cristales se obtuvieron en el sistema de gota colgante. (Se prefirió este



sistema de cristalización ya que en experimentos iniciales observamos que los cristales tendían a adherirse a la superficie de los pocillos al usar el sistema de gota sentada). Los patrones de difracción de rayos X de un gran número de cristales obtenidos en diferentes condiciones de cristalización se procesaron y las estructuras tridimensionales correspondientes fueron resueltas por reemplazamiento molecular. Sin embargo, la inspección de los mapas de densidad electrónica sólo reveló densidad para la molécula de trombina, y no así para el fragmento recombinante del sustrato (ver Anexo 10). Las estructuras de trombina y trombina-FPR resueltas en esta investigación son descritas en el epígrafe de Resultados 4.1.4 (ver tablas 4.4 y 4.7).

| Combinaciones de trombina y fragmentos de sustratos utilizados para los ensayos de cristalografía |                                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Variantes de trombina utilizadas                                                                  | Fragmentos recombinantes y mutantes utilizados |
| Trombina                                                                                          | FVIIIa1                                        |
|                                                                                                   | FVIIIa1 (R372Q)                                |
|                                                                                                   | FVIIIa1 (R372Q, G373P)                         |
|                                                                                                   | FVIIIa3                                        |
|                                                                                                   | FVIIIa3 (R1689Q)                               |
|                                                                                                   | PAR1 <sub>L</sub>                              |
|                                                                                                   | PAR1 <sub>L</sub> (R42Q)                       |
|                                                                                                   | PAR1 <sub>L</sub> (R42Q, S43P)                 |
| Trombina-FPR                                                                                      | FVIIIa1                                        |
|                                                                                                   | FVIIIa1 (R372Q)                                |
|                                                                                                   | FVIIIa3                                        |
|                                                                                                   | FVIIIa3 (R1689Q)                               |
|                                                                                                   | PAR1 <sub>L</sub>                              |
|                                                                                                   | PAR1 <sub>L</sub> (R42Q)                       |
| Trombina·benzamidina                                                                              | PAR1 <sub>L</sub>                              |

**Tabla 4.12 Relación exhaustiva de las combinaciones entre formas de la trombina y sus sustratos utilizadas en los ensayos de cristalización.** En el caso de los mutantes de los fragmentos recombinantes se utiliza la nomenclatura de aminoácidos de una letra para indicar los cambios realizados.

Con el objetivo de atrapar los complejos trombina·sustrato modulando las secuencias de los sitios de corte y activación de los mismos, se procedió a mutar los residuos de arginina (R) en la posición P<sub>1</sub> por glutamina (Q), eliminando la cadena lateral cargada de la arginina. Adicionalmente, se sustituyó también el residuo P<sub>1</sub>' por prolina, atendiendo a la dificultad de las proteasas serínicas para procesar enlaces Xxx-Pro (ver Tabla 4.12). Finalmente, para dificultar la

hidrólisis del enlace  $P_1-P_1'$  y favorecer así la cristalización de la trombina acomplejada, concentramos nuestra búsqueda de condiciones de cristalización en aquellas donde el pH de la solución es  $\leq 6.5$  (Nótese que la trombina tiene un máximo de actividad entre pH 7.4 - 8.0) [Fenton, Fasco, *et al.*, 1977]. Esta estrategia nos permitió sobreexpresar y purificar los mutantes FVIIIa1 (R372Q), FVIIIa1 (R372Q; G373P), FVIIIa3 (R1689Q), PAR1<sub>L</sub> (R42Q) y PAR1<sub>L</sub> (R42Q; S43P) para volver a realizar la búsqueda de condiciones de cristalización de los complejos de estos sustratos con la proteinasa. Esta estrategia se vio coronada por el éxito en el caso del complejo de trombina·PAR1<sub>L</sub>(R42Q), como veremos a continuación.

#### **4.2.4.1 Cristalización de la trombina en su complejo con la variante del dominio extracelular PAR1<sub>L</sub> (R42Q)**

El complejo trombina·PAR1<sub>L</sub>(R42Q) cristalizó de forma reproducible en la condición *Structure Screen 1-18* (0.1 M cacodilato sódico, pH 6.5, 0.2 M acetato sódico, 30% (p/v) PEG 8K. A partir de esta condición se diseñaron experimentos para mejorar la calidad de los cristales, siguiendo la metodología descrita en el epígrafe 3.7.2.1. Entre otros parámetros variamos las relaciones molares entre el dominio extracelular PAR1<sub>L</sub>(R42Q) y la trombina, la concentración final del complejo a dispensar en la placa y/o el volumen inicial de la gota dispensada. Los resultados de estos experimentos revelaron como parámetros críticos la relación molar de 2:1 entre el dominio extracelular de PAR1<sub>L</sub>(R42Q) y la trombina, y la concentración final a 2.5 mg/mL del complejo.

Los cristales obtenidos, de aspecto regular y de un tamaño aproximado de 0.1 x 0.1 x 0.1 mm (Anexo 9), presentan una gran resistencia mecánica y toleran la adición de una concentración máxima de 20% de glicerol para generar una disolución crioprotectora. El patrón de difracción de rayos X obtenido evidenció daños del cristal por radiación, pero aún así fue posible coleccionar un conjunto de datos completo de una resolución media razonable (levemente inferior a 3 Å) (ver Figura 4.24).

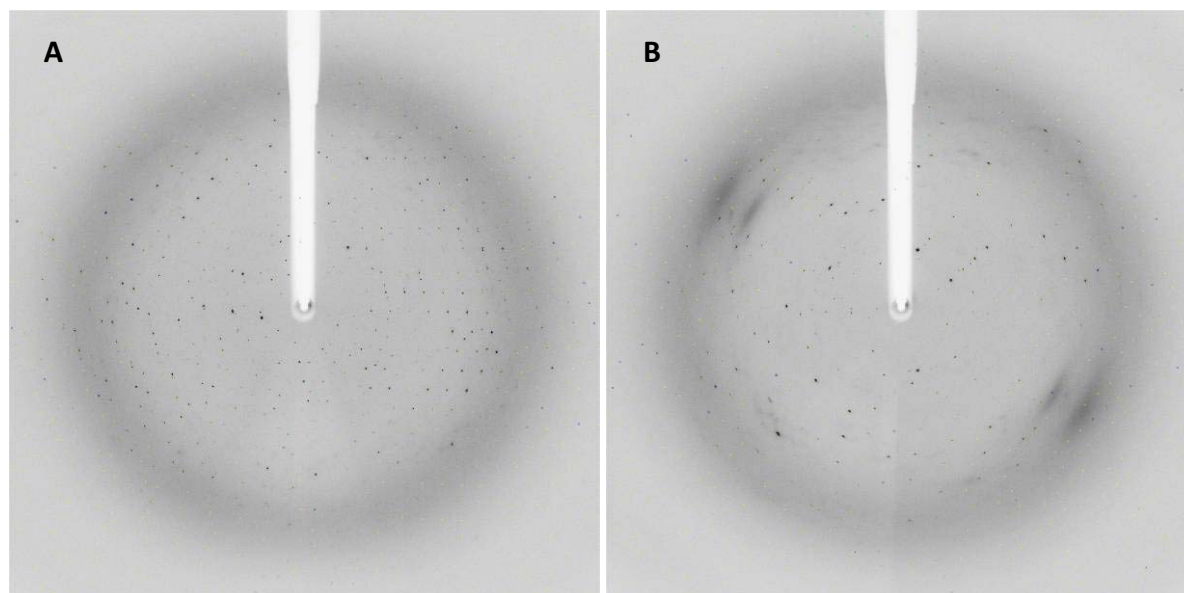
#### **4.2.4.2 El dominio extracelular de PAR1 interactúa con la trombina a través de su región semejante a la hirudina, Lys<sup>51</sup>-Glu<sup>57</sup>**

Los patrones de difracción de los cristales del complejo trombina·PAR1<sub>L</sub>(R42Q) se obtuvieron utilizando radiación de sincrotrón en las instalaciones del sincrotrón ESRF de

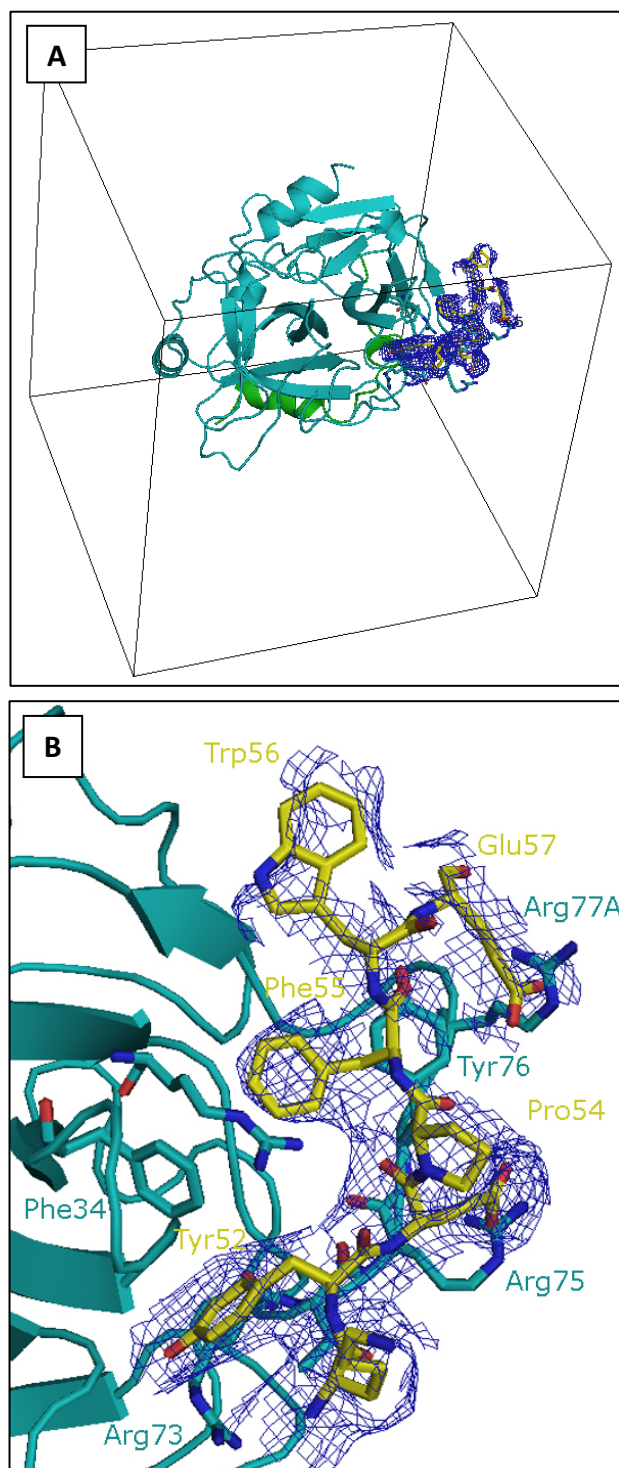
Grenoble (Francia) (línea microfocus ID23-2 e ID14-4). Se recogieron dos conjuntos de datos, de 200 y 160 imágenes cada uno, con los parámetros de recolección que se indican a continuación:

|                                              | <u>Línea ID23-2</u> | <u>Línea ID14-4</u> |
|----------------------------------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Longitud de onda:</b>                     | 0.8726 Å            | 0.9334 Å            |
| <b>Transmisión:</b>                          | 100%                | 50%                 |
| <b>Tiempo de exposición:</b>                 | 5.0 s               | 2.0 s               |
| <b>Oscilación (<math>\Delta\phi</math>):</b> | 1.5°                | 1 °                 |
| <b>Resolución de colecta:</b>                | 2.8 Å               | 3.0 Å               |

El indexado de los datos permitió establecer que los cristales pertenecen al grupo espacial monoclinico (C2), y que contienen una molécula de complejo por unidad asimétrica con un coeficiente de Matthews de 2.70 Å<sup>3</sup> por dalton de proteína, y un contenido de solvente estimado del 54.4% [Kantardjieff and Rupp, 2003, Matthews, 1968] (ver Figura 4.25A). Estos datos de difracción permitieron la resolución de la estructura 3D del complejo mediante reemplazamiento molecular, y en el posterior refinamiento de este modelo se obtuvo que el 98.92% de los residuos se encuentran dentro de las regiones más favorables o permitidas del gráfico de Ramachandran y el 99.39% de las distancias o ángulos no se desvían significativamente de los valores estándar, según el análisis realizado con MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) (ver Tabla 4.13).



**Figura 4.24** Imágenes obtenidas en dos posiciones ortogonales de los espectros de difracción de rayos X de un cristal de trombina-PAR1<sub>L</sub>(R42Q). A y B corresponden a un cristal del complejo crecido en 0.1 M cacodilato sódico, pH 6.5, 0.2 M acetato sódico y 30% (p/v) PEG 8K. En A se puede observar un patrón de difracción de apropiada calidad, pero en B, la calidad del patrón de difracción baja considerablemente. Las imágenes fueron tomadas en el sincrotrón ESRF (Grenoble), en la línea microfocus ID23-2, con un detector MAR/MOSAIC 225 CCD.



**Figura 4.25 Estructura del complejo trombina-PAR1<sub>L</sub>(R42Q).** **A.** El complejo cristalizó en el grupo espacial C2, con una molécula de trombina-PAR1<sub>L</sub>(R42Q) en la unidad asimétrica. **B.** Mapa de densidad electrónica calculado después de posicionar la molécula de trombina (se indica como una malla azul). Se observó una densidad electrónica clara en la que se modelaron los residuos Lys<sup>51</sup>-Glu<sup>57</sup> del fragmento PAR1<sub>L</sub> (representados como *sticks* [código de color: C, amarillo; N, azul; O, rojo]). La molécula de trombina se representa en color turquesa, y se destacan en representación de *stick* los residuos Phe<sup>34</sup>, Arg<sup>67</sup> y Arg<sup>75</sup>-Arg<sup>77A</sup>. Figuras generadas con PyMol (DeLano Scientific LLC, San Carlos, California, EEUU).

| Recolección de datos                                 |                                                                                                                    |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Fuente de RX                                         | ESRF ID23-2                                                                                                        |
| Longitud de onda (Å)                                 | 0.8726                                                                                                             |
| Grupo espacial                                       | C2                                                                                                                 |
| Constantes de celda                                  | a = 125.45 Å, b = 51.47 Å, c = 62.13 Å;<br>$\alpha = 90.00^\circ$ , $\beta = 98.80^\circ$ , $\gamma = 90.00^\circ$ |
| Resolución (última capa, Å)                          | 47.54 – 3.00 (3.16 – 3.00)                                                                                         |
| Número total de reflexiones                          | 85 629 (7 141)                                                                                                     |
| Número de reflexiones únicas                         | 7650 (1 148)                                                                                                       |
| I/ $\sigma$ (I)                                      | 12.4 (3.5)                                                                                                         |
| Compleitud (%)                                       | 99.95 (95.5)                                                                                                       |
| Redundancia                                          | 6.2 (6.2)                                                                                                          |
| $R_{\text{merge}}^*$ (%)                             | 10.1 (46.8)                                                                                                        |
| Refinamiento y análisis del modelo                   |                                                                                                                    |
| Resolución (última capa, Å)                          | 40.62 – 3.00 (3.078 – 3.000)                                                                                       |
| $R_{\text{factor}}^{\dagger}$ (%)                    | 20.76 (28.00)                                                                                                      |
| $R_{\text{free}}^{\ddagger}$ (%)                     | 26.84 (36.00)                                                                                                      |
| Porcentaje residuos con enlaces erróneos             | 0.26                                                                                                               |
| Porcentaje residuos con ángulos erróneos             | 0.35                                                                                                               |
| Gráfico de Ramachandran (favorecidos / outliers) (%) | 93.53 / 1.08                                                                                                       |
| Clashscore (todos los átomos) <sup>§</sup>           | 30.9 (percentil 81) <sup>  </sup>                                                                                  |
| Puntuación MolProbity <sup>¶</sup>                   | 2.50 (percentil 94) <sup>  </sup>                                                                                  |

**Tabla 4.13** Parámetros estadísticos de la calidad de los datos de difracción y del refinamiento para el complejo Trombina-PAR1<sub>L</sub>R42Q.

\* $R_{\text{merge}} = \sum_i \sum_h |I(h_i) - \langle I(h) \rangle| / \sum_i \sum_h I(h_i)$ , donde  $I(h_i)$  es la intensidad de la reflexión  $h$  determinada para la medida  $i$ , y  $\langle I(h) \rangle$  es el valor medio.

<sup>†</sup> $R_{\text{factor}} = \sum (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|) / \sum |F_{\text{obs}}|$ , donde  $|F_{\text{obs}}|$  y  $|F_{\text{calc}}|$  son las amplitudes del factor de estructura observado y calculado, respectivamente.

<sup>‡</sup> $R_{\text{free}}$ :  $R_{\text{factor}}$  calculado para un set de prueba seleccionado al azar que comprendía un 5% de las reflexiones totales y que fue excluido del refinamiento.

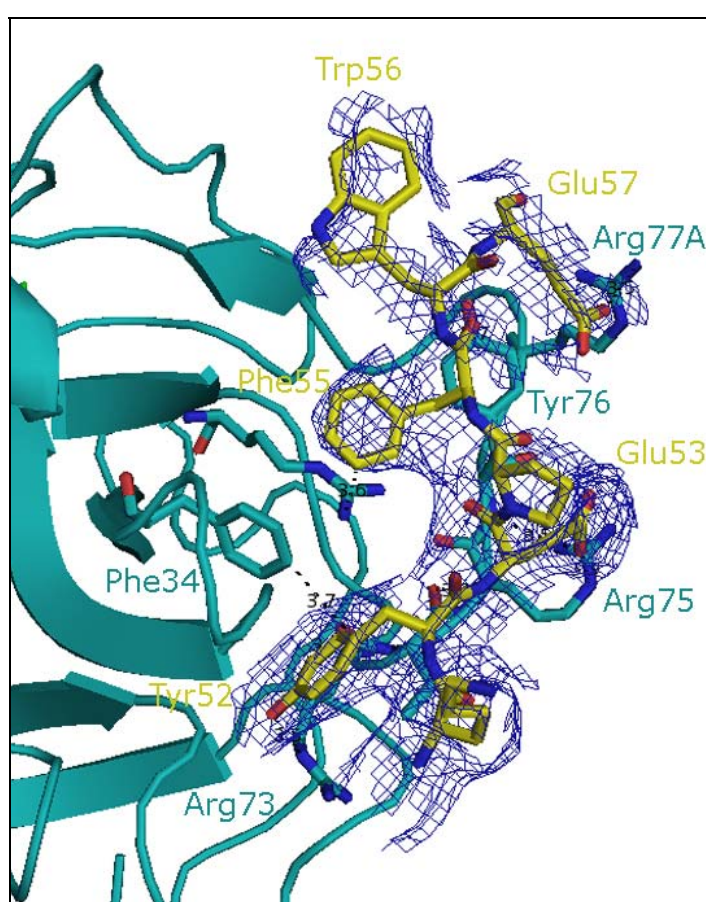
<sup>§</sup>Clashscore es el número de solapamientos estéricos graves ( $> 0.4$  Å) por 1000 átomos.

<sup>||</sup>El percentil 100 es el mejor entre las estructuras de resolución comparable ( $3.00 \pm 0.25$  Å); y el percentil 0 es el peor.

<sup>¶</sup>La puntuación MolProbity se define como  $0.42574 \cdot \log(1 + \text{clashscore}) + 0.32996 \cdot \log(1 + \max(0, \% \text{RotOut} - 1)) + 0.24979 \cdot \log(1 + \max(0, 100 - \% \text{RamaFavored} - 2)) + 0.5$ , donde  $\% \text{RotOut}$  es el porcentaje de los rotámeros de cadena lateral no válidos y  $\% \text{RamaFavored}$  es el porcentaje de los residuos en las regiones favorecidas del diagrama de Ramachandran.

La inspección de los mapas de densidad electrónica generados tras situar la molécula de la proteinasa en la unidad asimétrica reveló inmediatamente densidad electrónica adicional

cerca del área del exosito I, en la que el péptido Lys<sup>51</sup>-Glu<sup>57</sup> del dominio extracelular del PAR1 humano pudo ser modelado (Figura 4.26). El análisis estructural mostró que la cadena lateral de la Try<sup>52</sup> de PAR1 está completamente anclada en el exosito I de la trombina, ocupando un bolsillo hidrofóbico formado por átomos tanto de la cadena principal como de las cadenas laterales de los residuos Phe<sup>34</sup>, Leu<sup>40</sup>, Arg<sup>67</sup>, Arg<sup>73</sup> y Thr<sup>74</sup>. En particular, los átomos de carbono del anillo fenólico del residuo Try<sup>52</sup> (PAR1) se localizan entre 3.7 y 4.3 Å del anillo bencénico de la Phe<sup>34</sup>, lo que ilustra la fortaleza de las interacciones de Van der Waals entre estos residuos (Figura 4.26), también se evidencia un enlace de puente de hidrógeno entre el grupo fenólico de la Try<sup>52</sup> y el grupo guanidinio de la las Arg<sup>73</sup>.



**Figura 4.26** Vista detallada de la región alrededor del exosito I de la trombina en el complejo trombina-PAR1<sub>I</sub>(R42Q). La secuencia similar a la hirudina más próxima al extremo N-terminal de PAR1, Lys<sup>51</sup>-Glu<sup>57</sup>, se une a lo largo del exosito I de la trombina. Se muestran en *sticks* residuos del lazo 70-80 de la trombina y las cadenas laterales de la Phe<sup>34</sup> y la Arg<sup>67</sup>. El mapa de densidad electrónica correspondiente al PAR1 se indica como una malla azul. Los residuos de PAR1 se colorean en amarillo (carbono) y los de la trombina en color turquesa (carbono); en ambas moléculas el nitrógeno se representa en azul intenso y el oxígeno en rojo. Las interacciones electrostáticas entre residuos se indican mediante líneas amarillas discontinuas.

Interacciones polares entre ambas moléculas contribuyen a la estabilidad del complejo, además, participan en interacciones importantes para la estabilización del receptor PAR1 en el exosito I, el residuo Glu<sup>53</sup> con la formación de dos enlaces de hidrógeno, uno a través del

átomo de nitrógeno de la cadena principal con el grupo carbonilo de la Thr<sup>74</sup> de la trombina; y el segundo, a través del grupo carboxilato con el átomo de nitrógeno de la cadena principal del residuo de Tyr<sup>76</sup>. Mediante fuerzas de Van der Waals, la Phe<sup>55</sup> interacciona a través del anillo bencénico y del grupo carbonilo, con el grupo guanidinio de la Arg<sup>67</sup> (3.6 Å) y con el anillo fenólico de la Tyr<sup>76</sup> (3.7 Å), respectivamente. Mientras que las cadenas laterales del residuo Glu<sup>57</sup> de PAR1 y el residuo Arg<sup>77A</sup> de la proteinasa presentan interacciones polares entre sí.

Desafortunadamente, pese a la resolución obtenida, las limitaciones por el empaquetamiento cristalino impiden definir el recorrido seguido por el resto del dominio extracelular de PAR1 a lo largo de la superficie de la trombina para posicionar el sitio de corte, Arg<sup>42</sup>-Ser<sup>43</sup>, en el centro activo de la proteinasa.

#### **4.2.5 Análisis de la interacción del conector FVIIIa1 con la trombina y el factor X mediante resonancia magnética nuclear**

---

Para analizar cualitativa y cuantitativamente las interacciones entre los conectores del FVIII y la trombina utilizamos espectroscopía mediante resonancia magnética nuclear (RMN) de proteínas. Como se mencionó en el epígrafe 3.8 de Materiales y Métodos, algunos núcleos atómicos sometidos a un campo magnético externo absorben radiación electromagnética a una determinada radiofrecuencia que depende del entorno de estos núcleos, lo que permite en última instancia determinar la estructura de dicha molécula. Entre los núcleos atómicos más importantes para la RMN de moléculas orgánicas, y que se utilizaron en estos estudios según la necesidad, están el <sup>1</sup>H, el <sup>13</sup>C y el <sup>15</sup>N (epígrafe 3.8.1).

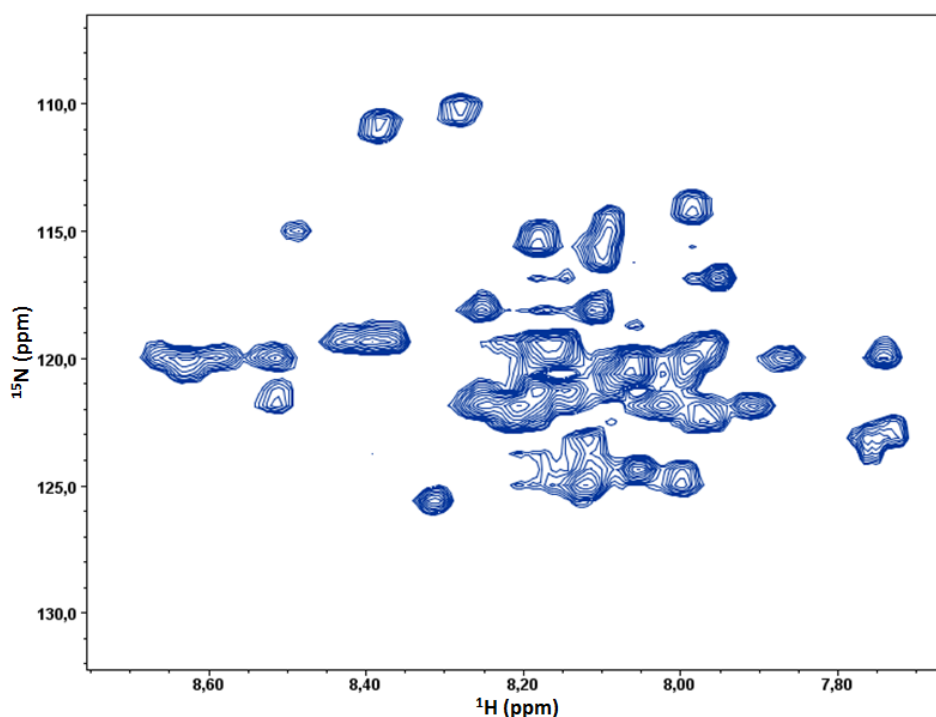
##### **4.2.5.1 Estudios preliminares de la interacción entre el fragmento recombinante FVIIIa1-<sup>15</sup>N con la trombina mediante resonancia magnética nuclear**

Para obtener resultados óptimos en los ensayos de RMN de proteínas se deben de tener en cuenta diferentes variables, la primera de ellas es reducir la señal que generan los protones del agua (<sup>1</sup>H); para ello a las muestras a estudiar se les añade un 15% (v/v) de agua deuterada (<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O), reduciendo así la señal de fondo debida al solvente. La segunda variable de gran importancia es el mantenimiento del mismo tampón (composición y pH) y de un volumen constante de muestra, dado que pequeñas variaciones de estos parámetros pueden generar cambios espurios en los patrones de resonancia obtenidos. Por esta razón, las muestras a ser



usadas en ensayos de RMN fueron dializadas exhaustivamente contra el tampón 25 mM de fosfato de sodio, pH 6.0, 25 mM NaCl, 500  $\mu$ M EDTA y 5 mM de TCEP.

Como primer paso en nuestros estudios determinamos la concentración máxima a la que el FVIIIa1- $^{15}$ N se comporta como una especie monodispersa. Con este objetivo, realizamos varios ensayos monodimensionales de protón ( $^1$ H) del FVIIIa1- $^{15}$ N a concentraciones decrecientes desde 850 hasta 100  $\mu$ M. Estos ensayos preliminares permitieron determinar que la concentración óptima del fragmento recombinante era de 200  $\mu$ M (datos no mostrados). A continuación, en ensayos de correlación de dos dimensiones  $^1$ H- $^{15}$ N (o HSQC  $^1$ H- $^{15}$ N) se estableció la temperatura a la que se observa una mayor dispersión de las resonancias del protón amida ( $^1$ H) correlacionadas con las del nitrógeno-15 de los enlaces peptídicos de los diferentes residuos del conector FVIIIa1- $^{15}$ N. Se evaluaron temperaturas desde 5 hasta 25  $^{\circ}$ C, obteniéndose los mejores resultados a 5 $^{\circ}$ C (Figura 4.27).

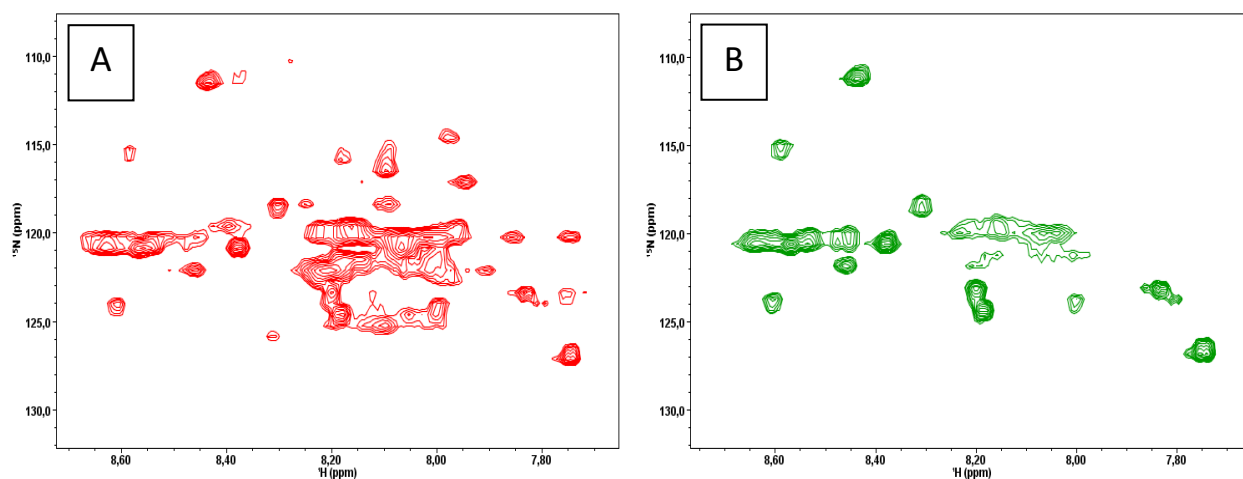


**Figura 4.27 Espectro preliminar de correlación  $^1$ H- $^{15}$ N del fragmento FVIIIa1- $^{15}$ N.** Patrón de dispersión de las resonancias del protón amida y del nitrógeno de los enlaces peptídicos del FVIIIa1- $^{15}$ N a una concentración de 200  $\mu$ M y a 5 $^{\circ}$ C. El espectro de resonancias HSQC  $^1$ H- $^{15}$ N (*H*eteronuclear *S*ingle *Q*uantum *C*orrelation) se obtuvo en un espectrómetro Bruker DMX 500 MHz. Los espectros fueron procesados con *NMRPipe* y se visualizaron e interpretaron con *NMRViewJ* (ver epígrafe 3.8.2 en Materiales y Métodos).

Una vez obtenido el espectro de correlación  $^1$ H- $^{15}$ N del fragmento FVIIIa1- $^{15}$ N, se registraron espectros adicionales del mismo en presencia de 20 y 40  $\mu$ M de trombina libre, para evaluar así la viabilidad de la técnica para estudiar las interacciones trombina-sustrato (Figura 4.28). Al comparar los espectros HSQC  $^1$ H- $^{15}$ N del fragmento FVIIIa1- $^{15}$ N aislado con los



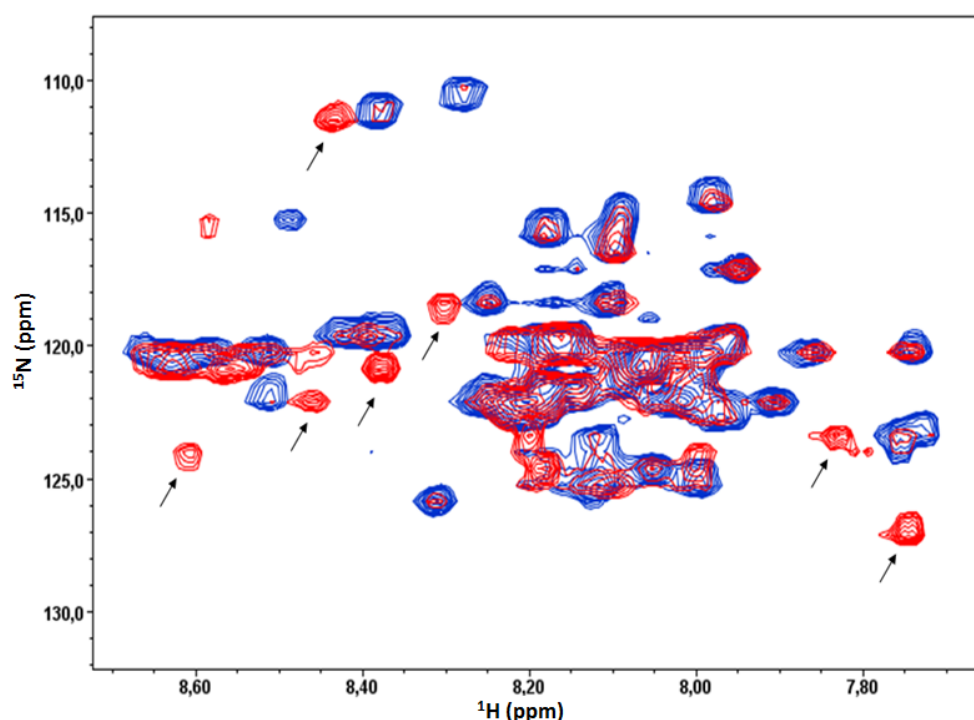
obtenidos en presencia de trombina se evidenciaron cambios notables en el desplazamiento químico (*chemical shifts*) de algunas de las resonancias (Figuras 4.27 y 4.28). En particular, algunas de las señales de resonancia cambiaron de intensidad mientras que otras se desplazaron de forma notable, sugiriendo la existencia de residuos específicos del FVIIIa1 que interaccionan con la trombina (Figura 4.28). El cambio de intensidad de algunas de las señales de resonancias se explica debido a que la amplitud de las señales de resonancia de una molécula relativamente pequeña libre en solución, -en este caso, el fragmento FVIIIa1-, es mayor que cuando esta interacciona con una macromolécula, como la trombina [Lane and Lefevre, 1994]. La formación de un complejo de un peso molecular mucho mayor conduce al ensanchamiento de algunas de las señales, lo que conlleva a una reducción de su amplitud e intensidad, y puede conducir incluso a la desaparición de la señal en el espectro de correlación.



**Figura 4.28 Cambios en los espectros de correlación  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del fragmento FVIIIa1- $^{15}\text{N}$  en presencia de trombina.** Se muestran los espectros HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del FVIIIa1- $^{15}\text{N}$  a 200  $\mu\text{M}$  obtenidos en presencia de 20 (A) y 40  $\mu\text{M}$  (B) de trombina. Nótese que al aumentar la concentración de trombina en la muestra una buena parte de las señales de resonancia desaparecen, pero algunas de ellas incrementan su intensidad. Como se verá en la siguiente figura, las señales que incrementan su intensidad son debidas a desplazamientos químicos notables.

Una de las características importantes de la interacción entre el conector FVIIIa1 y la trombina, que se deriva del análisis detallado de los espectros HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , es que el intercambio químico (*chemical exchange*) de las resonancias entre este fragmento del FVIII libre y unido a la trombina es lento. En efecto, si el intercambio entre el FVIIIa1 libre y el unido a la trombina fuese rápido, debería aparecer una señal de resonancia en una posición intermedia entre las correspondientes a estas dos conformaciones extremas. Sin embargo, esto no se observa, en cambio la intensidad de algunas de las señales de resonancia del FVIIIa1 libre disminuyen y las señales del conector acomplejado solamente incrementan su intensidad al

aumentar la concentración de trombina, sin percibirse ningún desplazamiento químico lineal unidireccional de las mismas (Figura 4.29). Estas observaciones confirman que el intercambio entre el FVIIIa1 libre y unido a la trombina es lento.

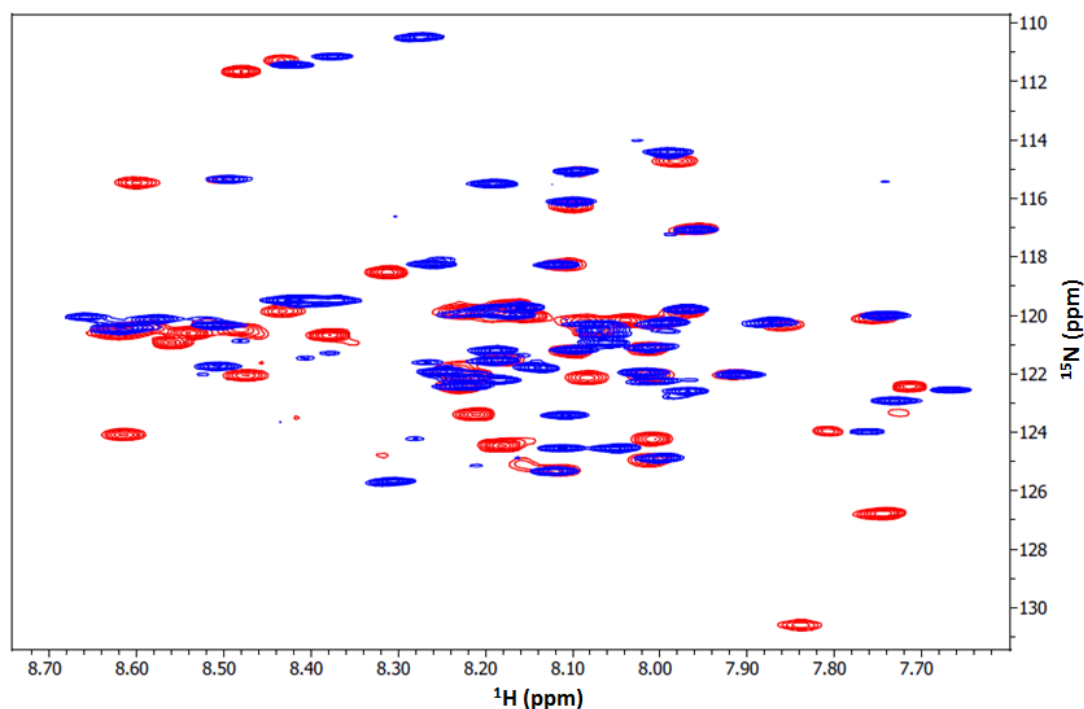


**Figura 4.29 Formación del complejo trombina-FVIIIa1 estudiada por RMN.** La figura muestra la superposición de los espectros HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del fragmento FVIIIa1- $^{15}\text{N}$  libre a 200  $\mu\text{M}$  (en azul) y en presencia de 20  $\mu\text{M}$  de trombina (en rojo), colectados en un espectrómetro Bruker DMX 500 MHz. Se evidencia la reducción de la intensidad de algunas señales del espectro en presencia de la trombina. Algunos de los desplazamientos químicos más evidentes se indican con flechas

#### **4.2.5.2 Efecto de la ocupación del sitio activo o del exosito I en la interacción entre el FVIIIa1- $^{15}\text{N}$ con la trombina**

Los resultados preliminares de los ensayos de RMN mostraron cambios significativos entre los espectros de resonancia del FVIIIa1 libre y en presencia de la trombina, confirmando así que ambas moléculas interactúan entre sí. Una vez verificado este punto, decidimos repetir los ensayos HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del fragmento FVIIIa1- $^{15}\text{N}$  descritos más arriba en un espectrómetro Bruker Avance III de 600 MHz con los siguientes objetivos (1) obtener espectros de mayor resolución, (2) analizar las consecuencias de bloquear el sitio activo de la trombina con FPR o el exosito I con el péptido C-terminal (Gly<sup>54</sup>-Gln<sup>65</sup>) de la hirudina (Hir-C) en la interacción trombina-sustrato (ver epígrafe 3.8.2 en Materiales y Métodos). Adicionalmente, planificamos ensayos para (3) evaluar una posible interacción entre el FVIIIa1 y el Factor X según lo reportado en la literatura (ver epígrafe 1.5.3 en Introducción).

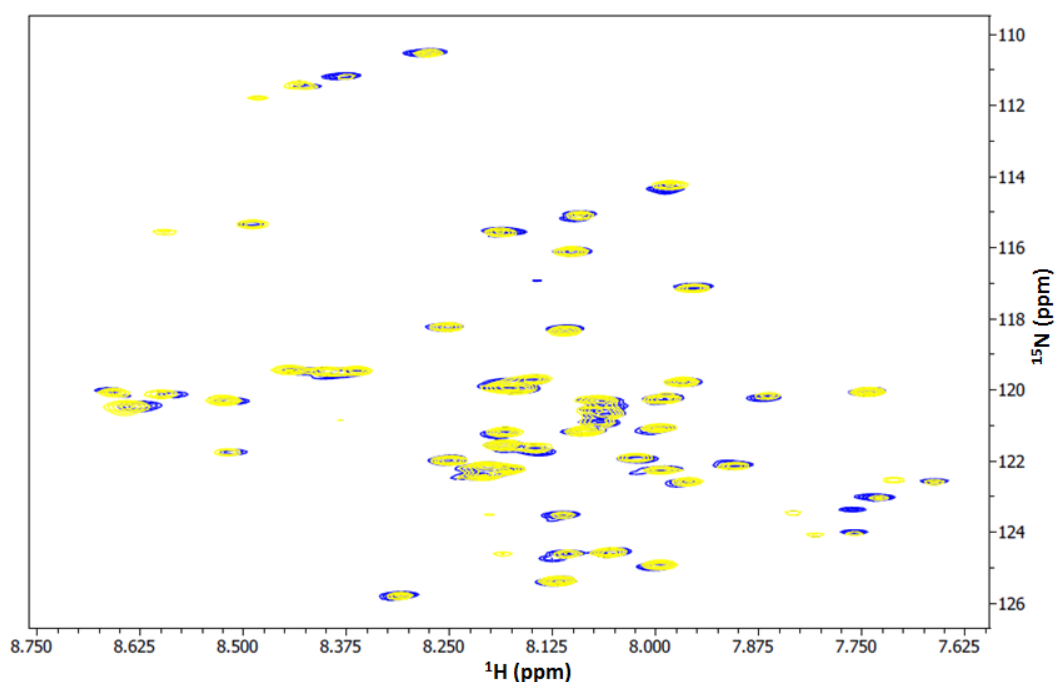
Los ensayos HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del fragmento FVIIIa1- $^{15}\text{N}$  en presencia de 20 y 40  $\mu\text{M}$  de trombina, realizados en el espectrómetro de 600 MHz confirmaron los resultados previamente obtenidos en el equipo de 500 MHz y permitieron obtener espectros HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  con resonancias mejor resueltas (comparar Figura 4.29 vs 4.30), sobretodo en la región central de los espectros.



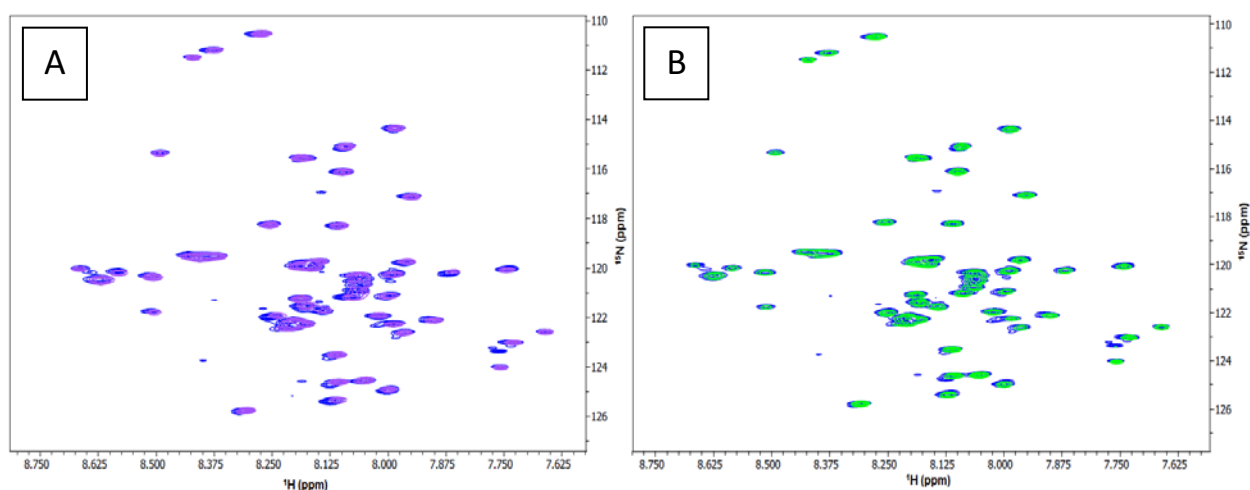
**Figura 4.30 Superposición de los espectros HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del fragmento FVIIIa1- $^{15}\text{N}$  libre y en presencia de 20  $\mu\text{M}$  de trombina.** Se presenta el patrón de las señales de resonancia colectadas en un espectrómetro Bruker Avance 600 MHz, del FVIIIa1- $^{15}\text{N}$  libre (en azul) y en presencia de 20  $\mu\text{M}$  de trombina (en rojo). Se evidencia una mejora en la dispersión y resolución de las resonancias, que permite en principio asignar los residuos aminoácidos del FVIIIa1 correspondientes a resonancias específicas. Los espectros fueron procesados con *NMRPipe* y se visualizaron e interpretaron con *NMRViewJ* y *CARA* (ver epígrafe 3.8.1 en Materiales y Métodos).

Por el contrario, en los ensayos HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del FVIIIa1- $^{15}\text{N}$  (200  $\mu\text{M}$ ) realizados en presencia de 20  $\mu\text{M}$  de trombina a la cual se le añadió previamente un exceso del péptido Hir-C no se observaron cambios significativos con relación al espectro del fragmento FVIIIa1 libre (Figura 4.31), indicando que en presencia de Hir-C, el FVIIIa1 parece no interaccionar con la proteinasa. Tampoco se observaron cambios significativos con relación al espectro de resonancias del fragmento FVIIIa1 libre en los experimentos HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de 200  $\mu\text{M}$  del fragmento FVIIIa1- $^{15}\text{N}$  en presencia de 10, 20 y 40  $\mu\text{M}$  de trombina inhibida irreversiblemente con FPR (Figura 4.32A), indicando que el FVIIIa1 no interacciona con la trombina-FPR, al menos en las condiciones de estos ensayos. Finalmente, los espectros HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de 200  $\mu\text{M}$  del fragmento FVIIIa1- $^{15}\text{N}$  aislado y en presencia de 10 y 20  $\mu\text{M}$  del Factor X, resultaron muy

similares (Figura 4.32B), indicando que el conector FVIIIa1 no interacciona con el factor X, al menos en estas condiciones experimentales.



**Figura 4.31** Superposición de los espectros HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del fragmento FVIIIa1- $^{15}\text{N}$  libre y en presencia de 20  $\mu\text{M}$  de trombina previamente incubada con un exceso del péptido C-terminal de la hirudina. Nótese la ausencia de diferencias significativas entre los espectros de resonancias entre el fragmento FVIIIa1 libre (azul) y en presencia de 20  $\mu\text{M}$  de trombina-Hir-C (amarillo).



**Figura 4.32** Superposición de los espectros HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del fragmento FVIIIa1- $^{15}\text{N}$  libre y en presencia de 40  $\mu\text{M}$  de trombina inhibida con FPR (A) y de 20  $\mu\text{M}$  del Factor X (B). En ambos casos, los resultados muestran que no hay diferencias significativas entre los espectros de resonancia del fragmento FVIIIa1 libre (azul) y los espectros equivalentes en presencia de trombina-FPR (lila) y FX (verde).

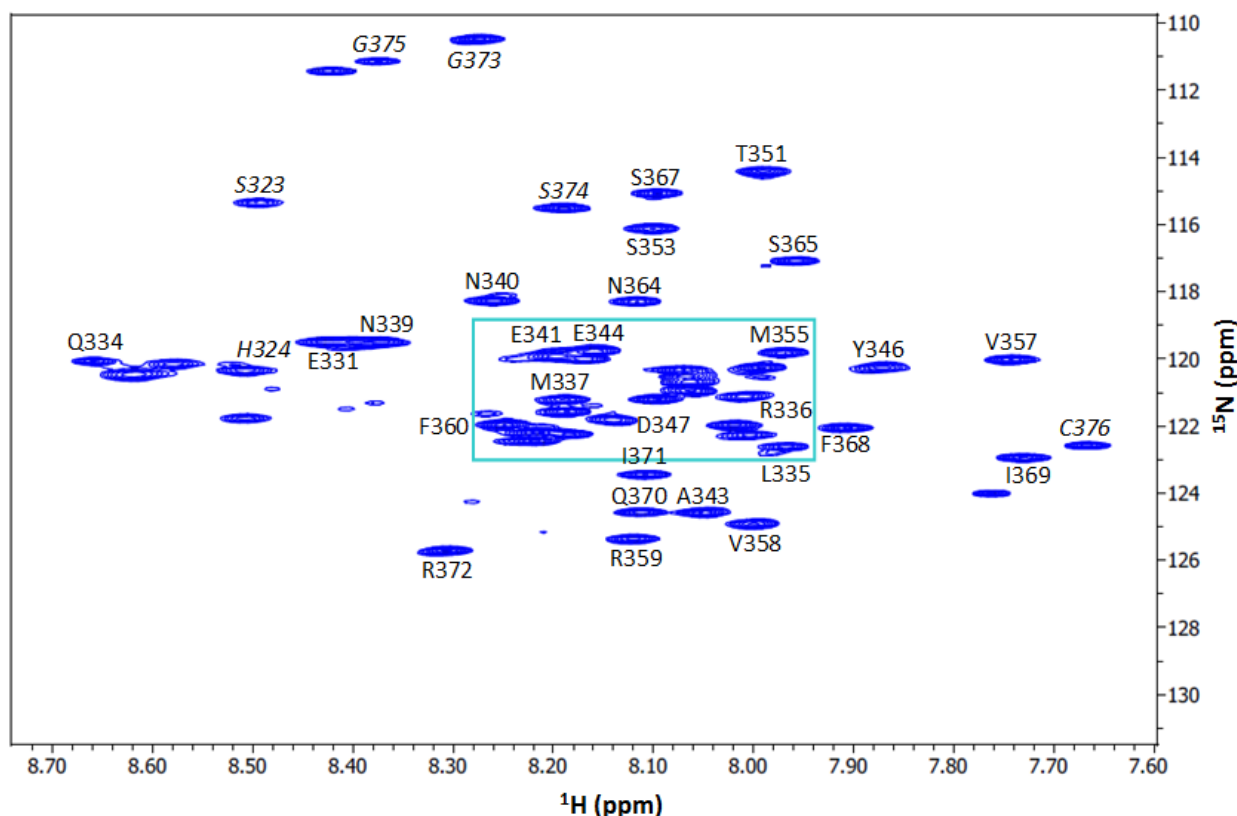
#### **4.2.5.3 Asignación de las resonancias del fragmento recombinante FVIIIa1 libre y en complejo con la trombina mediante experimentos de triple resonancia a través de protón**

Una vez comprobada la interacción del fragmento recombinante FVIIIa1 con la trombina libre, mediante espectros bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , procedimos a asignar las resonancias del esqueleto de carbonos  $\alpha$  y  $\beta$  del conector a partir de experimentos de triple resonancia del fragmento doblemente marcado, tanto con carbono-13 como con nitrógeno-15 (ver epígrafe 4.2.1.4). Para la asignación de las resonancias con estos experimentos se requiere una alta resolución, y por ello se utilizó un espectrómetro Bruker Avance 600 MHz y el fragmento FVIIIa1- $^{13}\text{C}$  $^{15}\text{N}$ . Para disminuir la duración de los experimentos de resonancias en los ensayos tridimensionales se trabajó con concentraciones absolutas de 400  $\mu\text{M}$  de FVIIIa1 y 40  $\mu\text{M}$  de trombina.

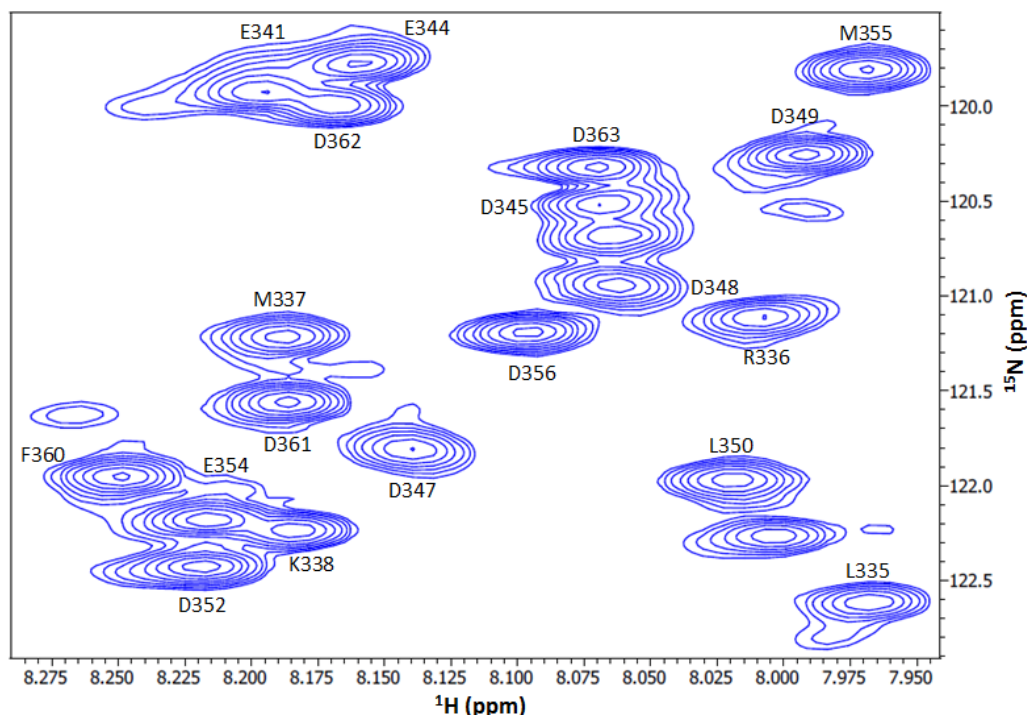
Se realizaron experimentos estándares de triple resonancia HNCO, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB y CBCA(CO)NH (ver Materiales y Métodos, epígrafe 3.8.2), que permitieron la asignación de las resonancias del fragmento FVIIIa1, tanto libre como en presencia de la trombina. El proceso de asignación se logró cruzando la información recolectada de cada uno de los experimentos 3D, que permitieron obtener los valores de desplazamiento químico de los carbonos  $\alpha$  y  $\beta$ , del grupo carbonilo, del grupo amino y del protón de las resonancias presentes en los espectros, y comparando con los valores de desplazamiento químico de los aminoácidos conocidos y depositados en la Base de Datos de Resonancias Magnéticas (ver Materiales y Métodos). Esto a su vez permitió asignar a determinadas resonancias los residuos del FVIIIa1 doblemente marcado, a través de la herramienta *StripScope* del software *CARA* (ver Anexo 11 y epígrafe 3.8.2 de Materiales y Métodos). La información de los residuos asignados del FVIIIa1- $^{13}\text{C}$  $^{15}\text{N}$  libre y en presencia de trombina, así como la tabla con los valores de los desplazamientos químicos observados correspondientes se presentan en los Anexos 12 y 13, respectivamente.

De esta forma, mediante resonancia de protones se logró asignar la casi totalidad de los residuos correspondientes a la secuencia del FVIIIa1, con la única excepción de Glu<sup>332</sup> y Glu<sup>342</sup>, debido probablemente al solapamiento de las señales de resonancia. Por supuesto en estos experimentos tampoco se pueden asignar las prolinas, debido a que carecen de protones amidas en los enlaces peptídicos (Figuras 4.33 y 4.34). Finalmente, se identificaron seis

resonancias (Figura 4.33; coordenadas: 8.6 ppm  $^1\text{H}$  y 120 ppm  $^{15}\text{N}$ ) que se ajustan a los valores de desplazamiento químico de las histidinas, y que corresponden a la cola 6xHis utilizada durante el proceso de purificación del fragmento. Sin embargo, solamente se asignó una de ellas dada la dificultad de identificar el orden de residuos iguales y consecutivos, y la irrelevancia de esta región para las interacciones con la trombina. La región más densa del espectro de la figura 4.33 (en recuadro) se amplía en la figura 4.34 para una mejor visualización de los residuos asignados.



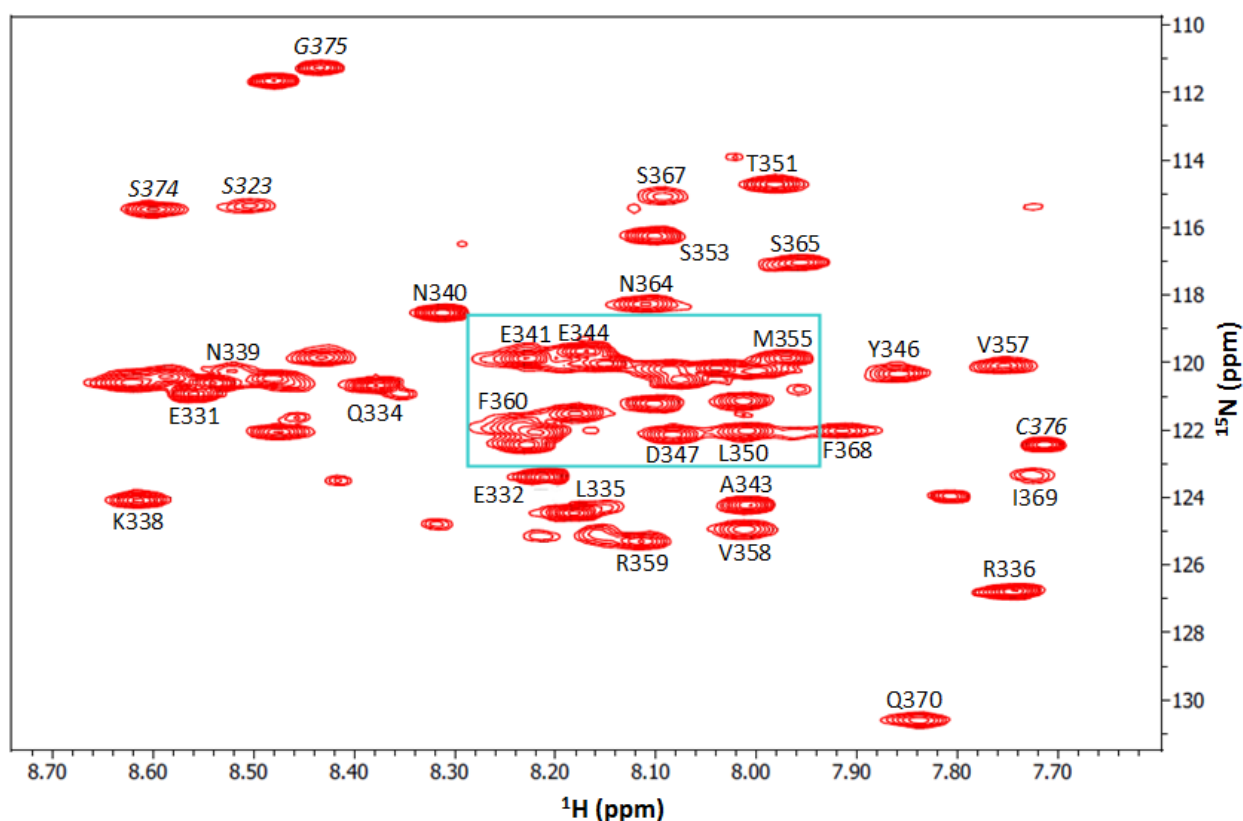
**Figura 4.33** Asignación mediante protón amida ( $^1\text{H}$ ) de los residuos del fragmento FVIIIa1 correspondientes a las resonancias en el espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ . La numeración corresponde a la del FVIII humano maduro. Los residuos asignados se muestran junto a las señales de resonancia correspondientes. Sin considerar las prolinas, que no son detectables mediante protón amida, solo dejaron de asignarse dos residuos correspondientes a la secuencia del FVIIIa1. Se resalta con un recuadro la zona que se amplía en la Figura 4.34. Los residuos en *italica* (del 322-329 y del 373-376) no corresponden al FVIIIa1 humano, sino al constructo utilizado para la expresión del fragmento recombinante.



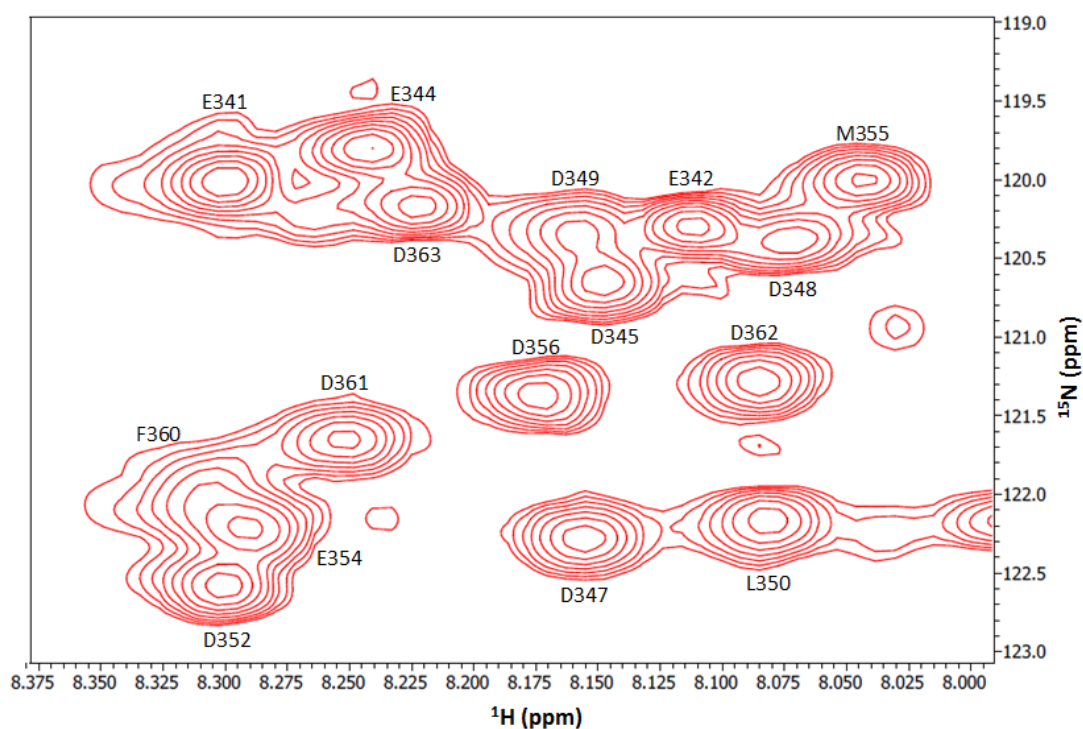
**Figura 4.34 Asignación de los residuos del fragmento FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  correspondientes al recuadro indicado en la figura 4.33.** La numeración corresponde a la del FVIII humano maduro. Se indican los residuos del fragmento recombinante FVIIIa1 asignados junto a las señales de resonancia correspondientes.

De forma similar, se logró asignar prácticamente la totalidad de los residuos del fragmento FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  en presencia de trombina mediante protón amida (Figura 4.35; la región más densa del espectro, indicada con un recuadro, se amplía en la figura 4.36). Es interesante destacar que se observó una reducción de la intensidad de algunas de las señales de resonancia (por ejemplo, Ser<sup>367</sup> e Ile<sup>369</sup>), e incluso la desaparición de las resonancias correspondientes a cuatro residuos (Met<sup>337</sup>, Ile<sup>371</sup>, Arg<sup>372</sup> y Gly<sup>373</sup>), a pesar de que las resonancias de estos residuos son perfectamente discernibles en los espectros del conector libre (Figura 4.33). La no detección de las resonancias correspondientes a estos residuos en presencia de trombina es muy probablemente debida al ensanchamiento de la señal, e indica que interaccionan con una afinidad particularmente elevada con la trombina.

Con la asignación de los residuos del fragmento FVIIIa1 libre y en presencia de trombina, la superposición de los espectros  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  permite determinar sin ambigüedades aquellos residuos cuyas resonancias experimentan desplazamientos notables (de hasta 0.4 ppm en el caso de las resonancias de protones; figura 4.37). Estos residuos se analizarán posteriormente con un conjunto de experimentos de adicionales de correlación  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  (epígrafe 4.2.5.4).

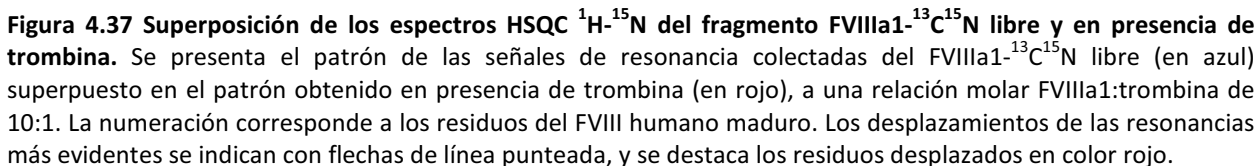


**Figura 4.35** Asignación mediante protón amida ( $^1\text{H}$ ) de los residuos del fragmento FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  en presencia de trombina a partir de las resonancias en el espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ . La numeración corresponde a la del FVIII humano maduro. Los residuos del fragmento recombinante del FVIIIa1 asignado se indican junto a las señales de resonancia correspondientes. Cuatro residuos (Met<sup>337</sup>, Ile<sup>371</sup>, Arg<sup>372</sup> y Gly<sup>373</sup>) asignados en el FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  libre no son detectados en este caso, debido al ensanchamiento de las señales correspondientes. Se marca en un recuadro la zona que se amplía en la Figura 4.36.



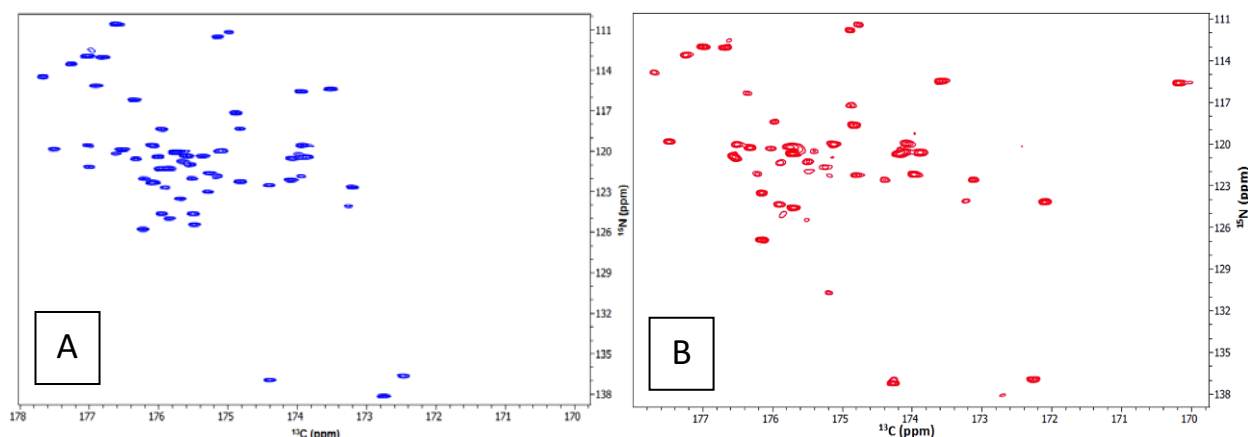
**Figura 4.36** Asignación de los residuos del fragmento FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  en presencia de trombina correspondientes al recuadro indicado en la figura 4.35. La numeración corresponde a la del FVIII humano maduro. Se indican los residuos del fragmento recombinante FVIIIa1 asignados junto a las señales de resonancia correspondientes.





La asignación de las resonancias del esqueleto de carbono de la cadena principal del fragmento FVIIIa1 mediante protón ( $^1\text{H}$ ) se confirmó mediante ensayos utilizando las resonancias de los átomos de  $^{13}\text{C}$ . Antes y durante el desarrollo de los experimentos se realizaron análisis de control para evaluar la calidad y el comportamiento de la muestra, incluyendo experimentos mono ( $^1\text{H}$ ) y bidimensionales ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ), obteniéndose resultados idénticos a los conseguidos en los ensayos previos de RMN (datos no mostrados). Una vez comprobada la calidad de las muestras del FVIIIa1- $^{13}\text{C}$  $^{15}\text{N}$ , se realizaron los experimentos bidimensionales de correlación  $^{13}\text{CO}$ - $^{15}\text{N}$  (CON). Estos experimentos son similares a los ensayos de correlación HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , pero en ellos se correlaciona el nitrógeno del grupo amino del residuo  $i$  ( $^{15}\text{N}_i$ ) con el carbonilo del residuo precedente ( $^{13}\text{C}_{i-1}$ ) [Takeuchi, Heffron, *et al.*, 2010]. La evaluación preliminar de los experimentos CON del fragmento FVIIIa1 libre y en

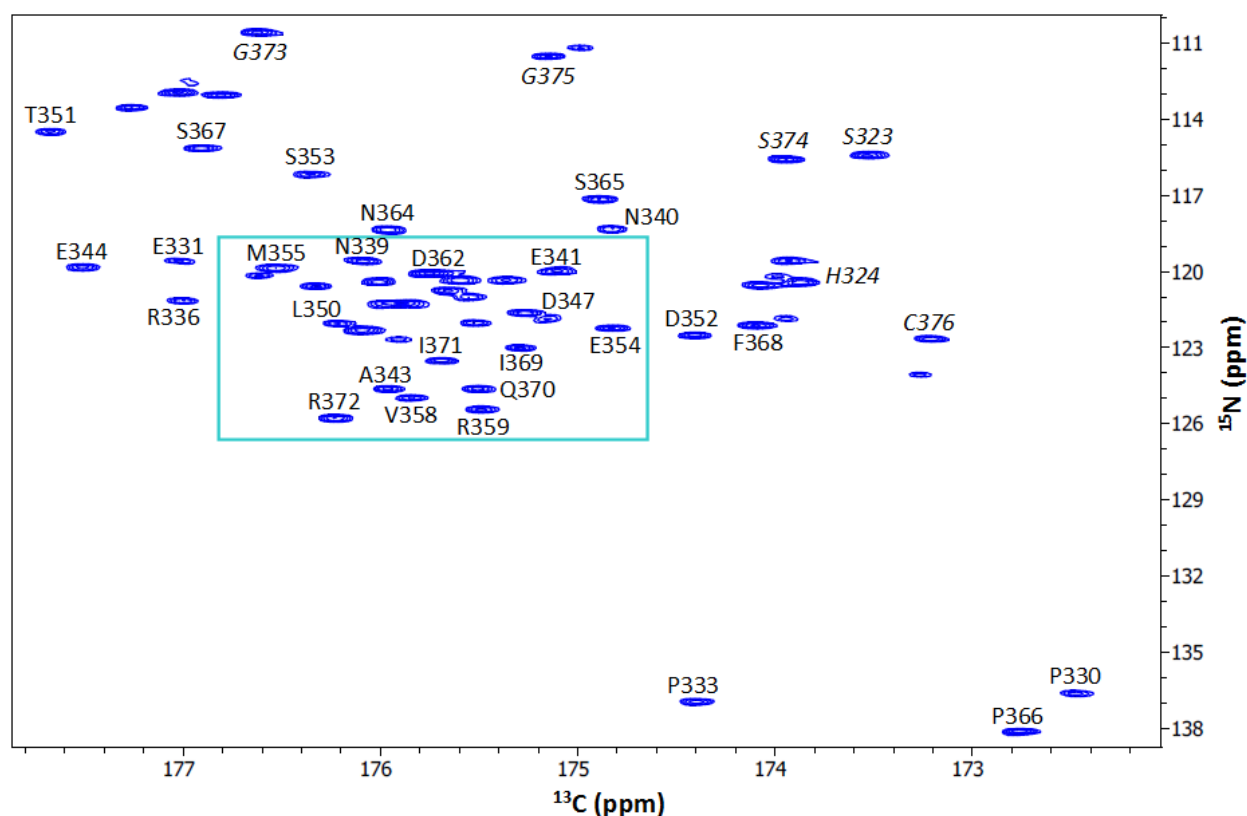
presencia de trombina demostró que las señales de resonancia del conector FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  varían en presencia de trombina (Figura 4.38), confirmando los resultados del epígrafe anterior.



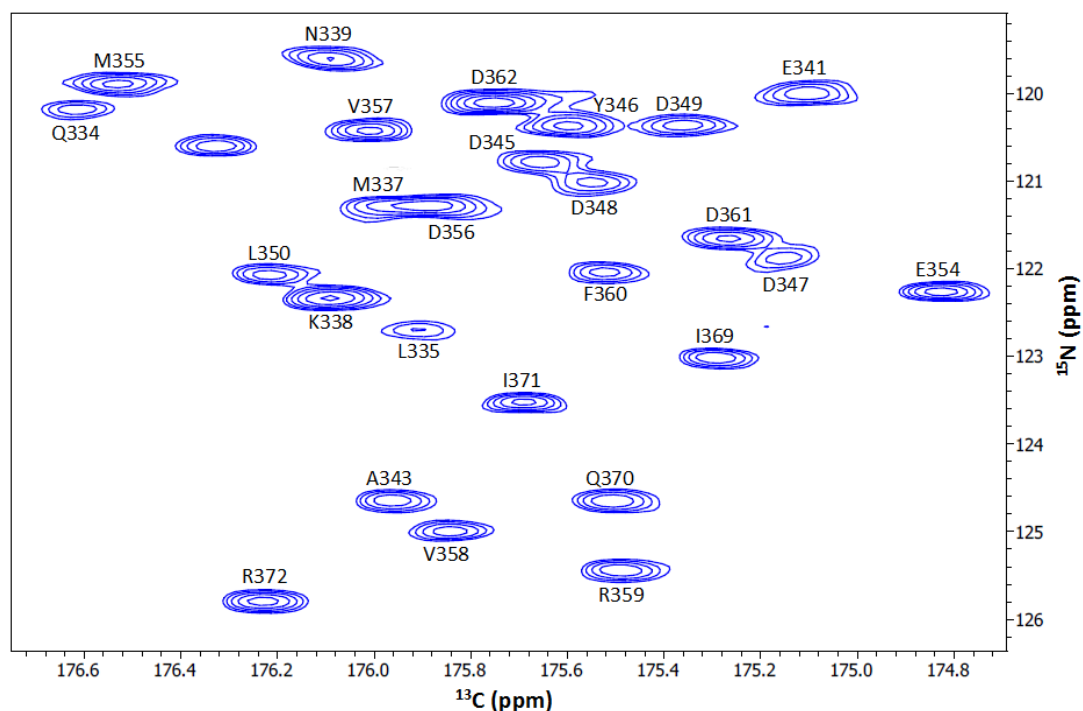
**Figura 4.38** Espectros de correlación  $^{13}\text{CO}-^{15}\text{N}$  (CON) del fragmento FVIIIa1 libre y en presencia de trombina. En A se presenta el patrón de las señales de resonancia colectadas del FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  libre (en azul) y en B la resonancia del FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  en presencia de trombina (en rojo), a una relación molar de 10:1 (400  $\mu\text{M}$ : 40  $\mu\text{M}$ ). Los espectros fueron procesados con *NMRPipe* y se visualizaron e interpretaron con *NMRViewJ* y *CARA* (ver epígrafe 3.8.2 en Materiales y Métodos).

Para la asignación mediante  $^{13}\text{C}$  se realizó un conjunto de experimentos de doble (CACO, CBCACO) y de triple resonancia (CBCACON y CBCANCO), en un espectrómetro Bruker UltraShield 700 MHz con una sonda CPTX03 calibrada para carbono-13 (ver Materiales y Métodos, epígrafe 3.8). La asignación de los residuos a las resonancias correspondientes del fragmento FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  libre y en presencia de trombina se realizó utilizando la información cruzada colectada de cada uno de los experimentos para asignación mediante  $^{13}\text{C}$ , y se corroboró con los experimentos previos de asignación mediante  $^1\text{H}$ . Los valores de desplazamientos químicos observados en los espectros de doble y triple resonancia correspondientes se confirmaron con los valores de desplazamiento químico de los aminoácidos de la Base de Datos de Resonancia Magnética (ver Materiales y Métodos). En los Anexos 12 y 13 se presentan las tablas con los valores de desplazamiento químico observados para los residuos del fragmento FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ .

Los resultados de la asignación se observan en la figura 4.39, y la región más densa del espectro (en recuadro) se amplía en la figura 4.40 para una mejor visualización de los residuos asignados. La asignación mediante carbono-13 permitió detectar las tres prolinas presentes en el fragmento FVIIIa1, lo cual no es posible mediante espectros de resonancia de protón (Figura 4.33). De este modo, y sin considerar la cola de histidinas, se logró asignar la casi totalidad de las resonancias correspondientes al fragmento recombinante FVIIIa1, tanto libre (96% de los residuos), como en presencia de trombina (93%) (ver Figuras 4.39 y 4.41).

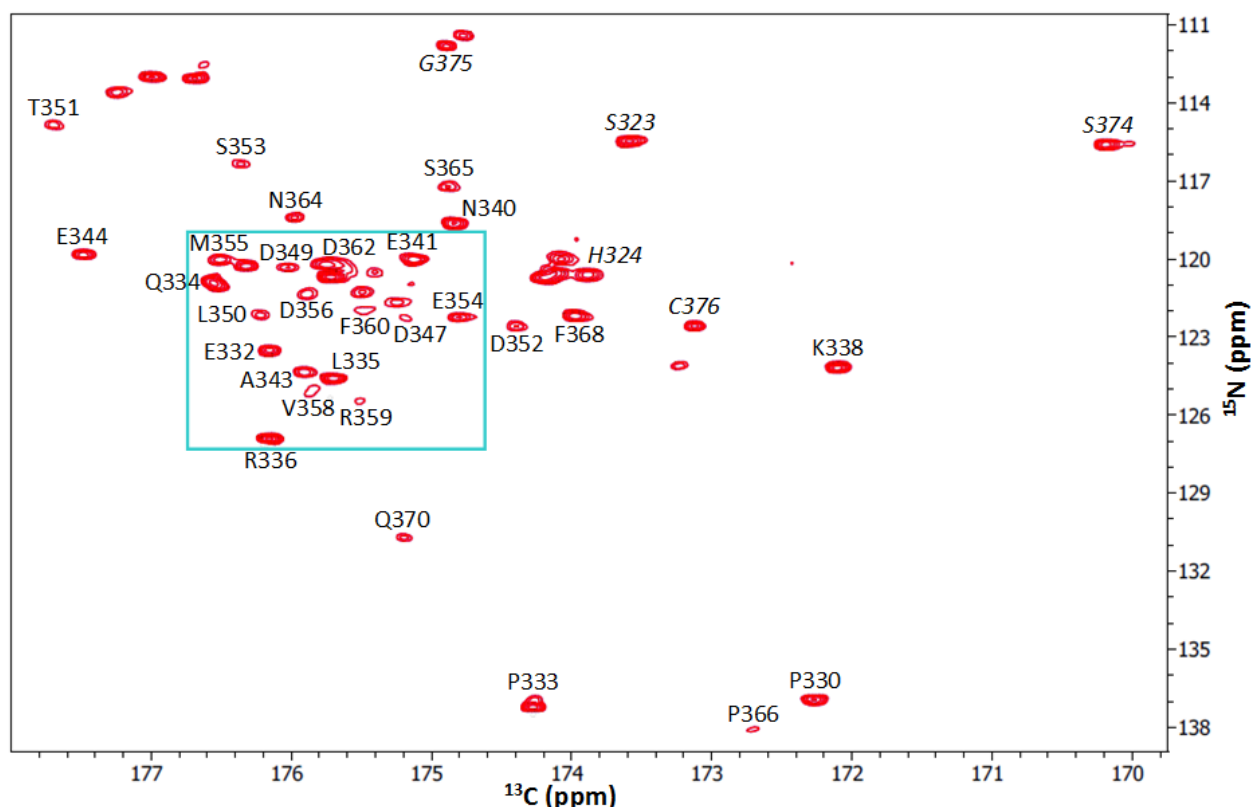


**Figura 4.39** Asignación mediante carbono-13 de los residuos del fragmento FVIIIa1 correspondientes a las resonancias en el espectro de correlación  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ . La numeración corresponde a la del FVIII humano maduro. Se indican los residuos del fragmento recombinante FVIIIa1 asignados junto a las señales de resonancia correspondientes. Nótese la asignación de las tres prolina del fragmento FVIIIa1 en la región alrededor de 136 ppm del nitrógeno-15. Se resalta con un recuadro la zona que se amplía en la Figura 4.40. Los residuos en *italica* (del 322-329 y del 373-376) no corresponden al FVIIIa1 humano, sino al constructo utilizado para la expresión del fragmento recombinante.



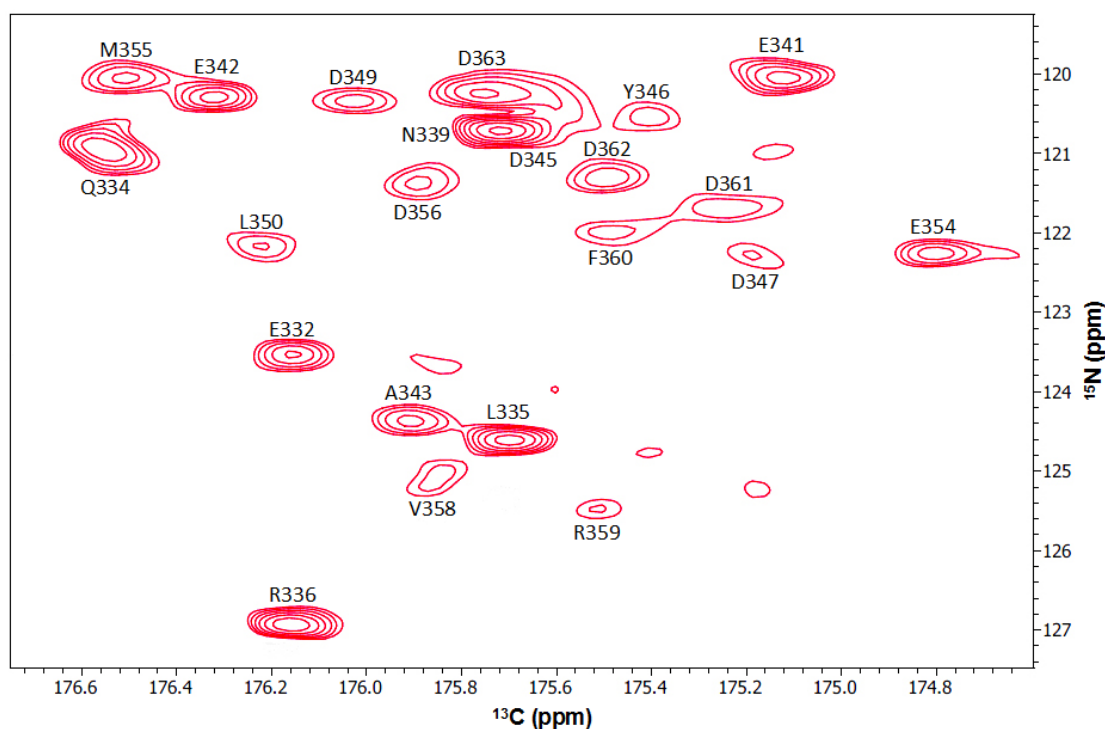
**Figura 4.40** Asignación de los residuos del fragmento FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  correspondientes al recuadro indicado en la figura 4.39. La numeración corresponde a la del FVIII humano maduro. Se indican los residuos del FVIIIa1 asignados junto a las señales de resonancia correspondientes del ensayo CON.

Al igual que en los ensayos de correlación  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  y de asignación mediante protón, en los ensayos de correlación  $^{13}\text{CO}$ - $^{15}\text{N}$  del fragmento FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  en presencia de trombina se observó una reducción de la intensidad de algunas de las señales de resonancia comparadas con las del conector libre (Figuras 4.41 y 4.42 (ampliación del recuadro)). Al igual que en la asignación mediante protón, no se detectaron las señales correspondientes a cuatro residuos (Met<sup>337</sup>, Ile<sup>371</sup>, Arg<sup>372</sup> y Gly<sup>373</sup>), confirmando que interaccionan con alta afinidad con la proteasa activadora.

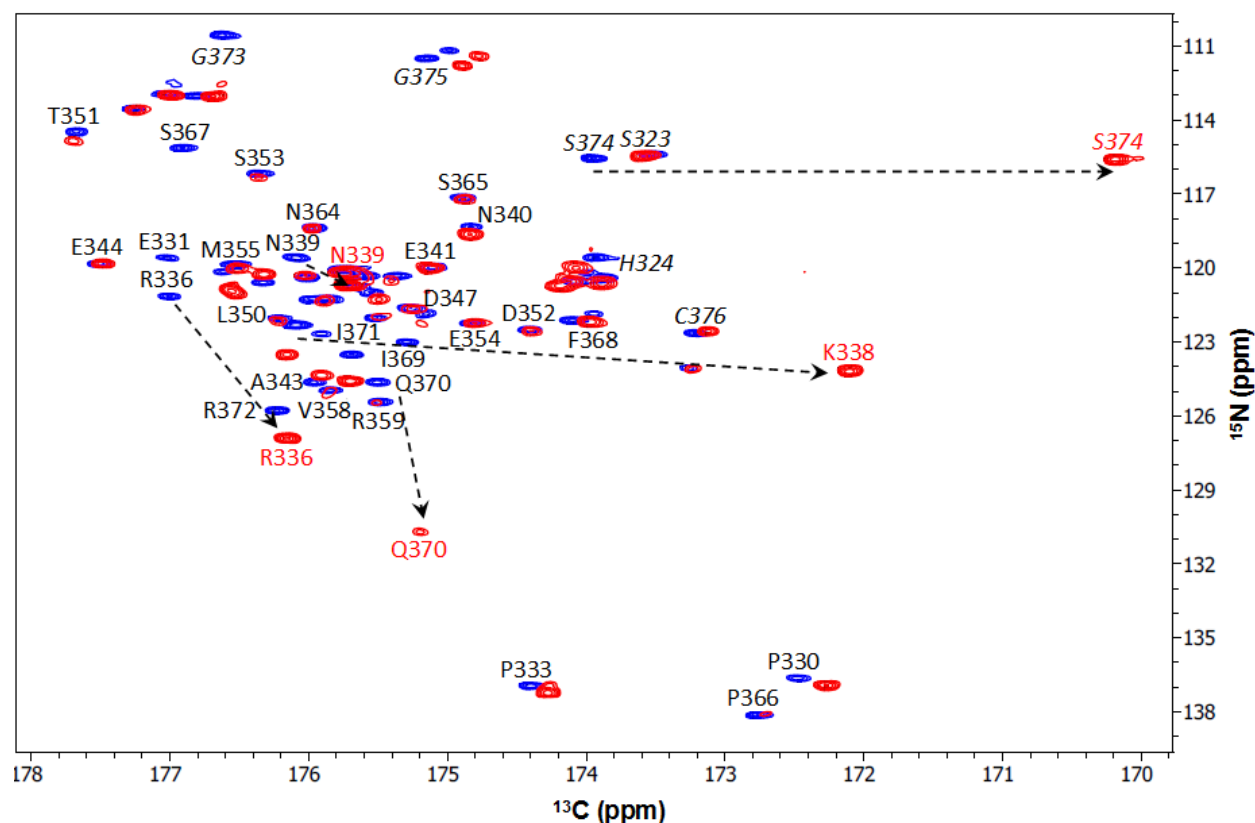


**Figura 4.41 Asignación mediante carbono-13 de los residuos del fragmento FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  en presencia de trombina a partir de las resonancias en el espectro de correlación  $^{13}\text{CO}^{15}\text{N}$ .** La numeración corresponde a la del FVIII humano maduro. Se indican los residuos del FVIIIa1 asignados a las señales de resonancia correspondientes. Se observa la reducción en la intensidad y el desplazamiento de varias señales de resonancia al compararlas con la figura 4.39 del FVIIIa1 libre. La zona que se amplía en la Figura 4.42 se resalta con un recuadro. Los residuos en *itálica* (del 322-329 y del 373-376) no corresponden al FVIIIa1 humano, sino al constructo utilizado para la expresión del fragmento recombinante.

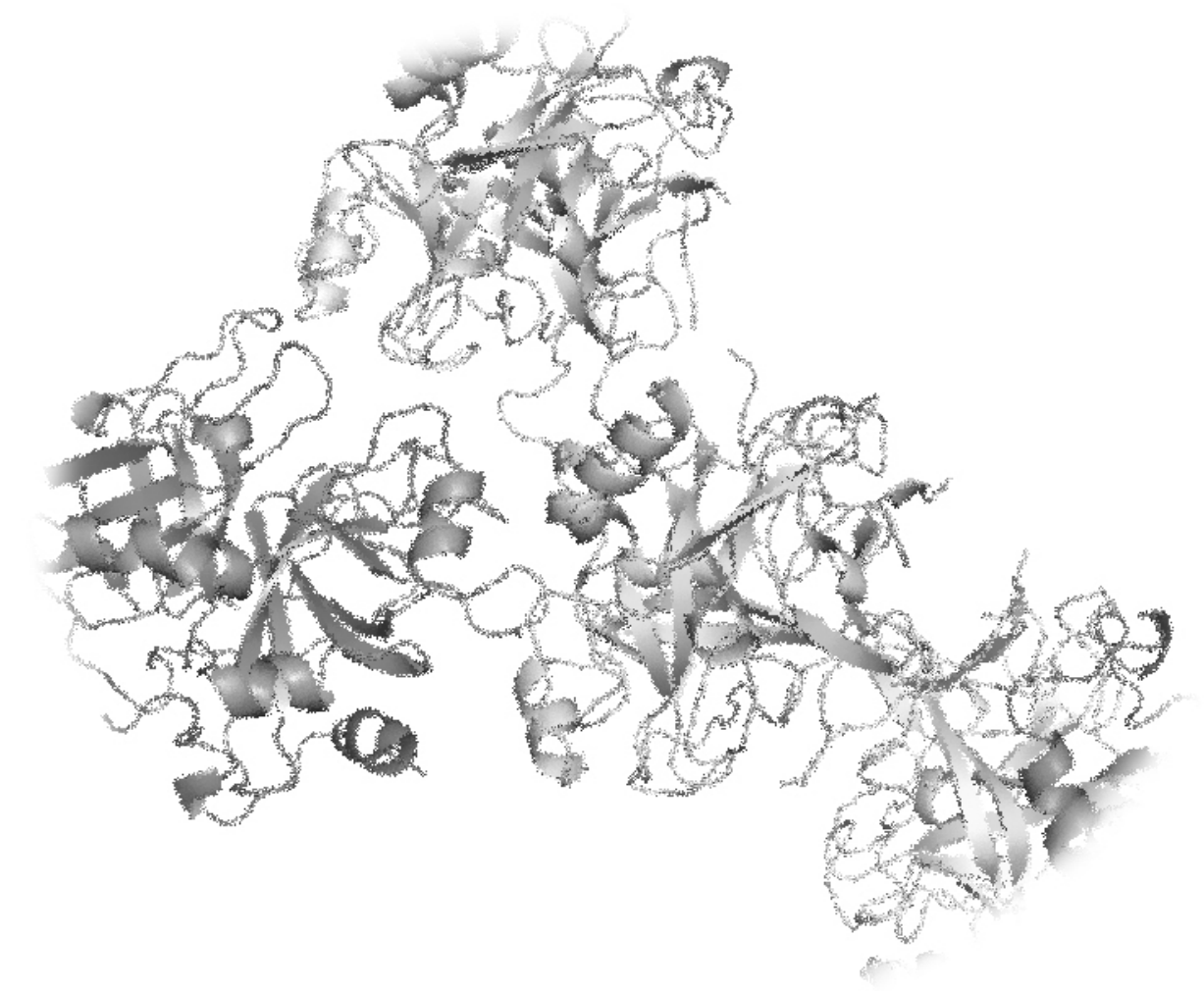
Al superponer los espectros CON del fragmento FVIIIa1 libre y en presencia de trombina se lograron identificar los residuos específicos del conector FVIIIa1 cuyas resonancias se desplazan de forma notable al unirse a la trombina (Figura 4.43), confirmando los resultados presentados en el epígrafe anterior.



**Figura 4.42 Asignación de los residuos del fragmento FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  en presencia de trombina correspondientes al recuadro indicado en la figura 4.41.** La numeración corresponde a la del FVIII humano maduro. Se indican los residuos del conector FVIIIa1 asignados a las señales de resonancia correspondientes del ensayo CON.



**Figura 4.43 Superposición de los espectros CON del fragmento FVIIIa1 libre y en presencia de trombina.** Se presenta el patrón de las señales de resonancia del FVIIIa1- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  libre (en azul) superpuesto en el mismo fragmento en presencia de trombina (en rojo), a una relación molar FVIIIa1:trombina de 10:1. La numeración corresponde a los residuos del FVIII humano maduro. Los desplazamientos de las resonancias más evidentes se indican con flechas de línea punteada, y se destaca los residuos desplazados en color rojo.



## 5. DISCUSIÓN



## 5.1 ESTRUCTURA DE LA TROMBINA ES MODULADA POR LIGANDOS ESPECÍFICOS DEL SITIO ACTIVO Y DEL EXOSITIO I

Las numerosas estructuras 3D de la trombina unida a varios inhibidores peptídicos [Corral-Rodriguez, Macedo-Ribeiro, *et al.*, 2009, van de Locht, Stubbs, *et al.*, 1996, Fuentes-Prior, Noeske-Jungblut, *et al.*, 1997, Richardson, Kroger, *et al.*, 2000, Macedo-Ribeiro, Almeida, *et al.*, 2008, Corral-Rodriguez, Macedo-Ribeiro, *et al.*, 2010, Figueiredo, de Sanctis, *et al.*, 2012, Rydel, Ravichandran, *et al.*, 1990, van de Locht, Lamba, *et al.*, 1995], receptores [Fuentes-Prior, Iwanaga, *et al.*, 2000, Dumas, Kumar, *et al.*, 2003, Celikel, McClintock, *et al.*, 2003], y más recientemente sustratos [Pechik, Madrazo, *et al.*, 2004, Corral-Rodriguez, Bock, *et al.*, 2011, Gandhi, Chen, *et al.*, 2010] (ver Anexo 1), han sido esenciales para comprender las bases moleculares de las interacciones de la proteasa con estos ligandos específicos, y sugerir vías para el desarrollo de antitrombóticos. Sin embargo, estos trabajos estructurales han contribuido a fijar una imagen más bien rígida de la estructura de la trombina, en la que la flexibilidad parece limitada a regiones relativamente poco significativas como por ejemplo algunos residuos del lazo 149, cuando no irrelevantes desde el punto de vista funcional como los extremos N- y C-terminales de la cadena ligera.

Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo, así como otros reportes recientes (discutidos más adelante) conducen ineludiblemente a un cambio de paradigma en este sentido, y revelan una enzima con un elevado grado de flexibilidad intrínseca, y cuya estructura es estabilizada de forma notable por interacciones con sus ligandos, fundamentalmente gracias a contactos con el sitio activo, pero también con los exositos I y II.

### 5.1.1 La estabilidad térmica de la trombina aumenta significativamente en presencia de ligandos unidos al sitio activo o al exosito I

Los resultados de nuestra investigación evidenciaron cambios significativos en la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) de la trombina libre e inhibida mediante las técnicas de microcalorimetría y termofluorescencia diferencial. Tal y como se presentó en los epígrafes 4.1.2 y 4.1.3 de Resultados, la magnitud del cambio en las temperaturas detectado mediante estas dos técnicas es levemente diferente (e.g. para trombina libre las  $T_m$  fueron 55.7 vs. 54.5 °C). Estas pequeñas diferencias se deben probablemente, aparte del hecho de que se trata de



dos técnicas bien diferenciadas, al empleo de diferentes concentraciones de proteína (1  $\mu$ M vs. 27  $\mu$ M) y volúmenes de muestra (20  $\mu$ l vs. 500  $\mu$ l), así como sensibilidades a las variaciones de los tampones utilizados. A pesar de estas leves diferencias es evidente la robustez de nuestros resultados ya que se confirman mutuamente y permiten la comparación entre ellos y con los resultados reportados por otros investigadores.

En nuestra investigación demostramos un incremento termodinámico muy notable en la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) y en la energía absorbida ( $\Delta H$ ) de la trombina humana irreversiblemente inhibida con FPR comparada con la proteasa libre ( $T_m$ = 79.8 vs 55.7 °C;  $\Delta H$  de 175.8 vs 80.3 kcal). Estos valores demuestran una estabilización de la estructura global de la trombina al ocuparse los subsitios de especificidad  $S_4$ ,  $S_2$  y  $S_1$  por los residuos D-Phe, Pro y Arg del inhibidor, respectivamente [Bode, Turk, *et al.*, 1992, Bode, Mayr, *et al.*, 1989]. Los valores de  $T_m$  de la proteasa humana libre o inhibida irreversiblemente con FPR obtenidos en esta investigación son muy similares a los reportados previamente por otros grupos, y son comparables también a los valores para dos zimógenos de la proteasa humana (discutidos más adelante) [Koeppe and Komives, 2006, Silva Vde, Cargnelutti, *et al.*, 2011, Croy, Koeppe, *et al.*, 2004].

¿Qué interacciones del inhibidor unido covalentemente a la trombina son responsables de este extraordinario incremento en la estabilidad térmica de la trombina? En principio los contactos que establece el residuo de arginina derivatizado con los residuos que forman el bolsillo  $S_1$  de especificidad parecen ser poco relevantes en este sentido, si consideramos nuestros resultados con la trombina incubada con benzamidina. La ausencia de cambios significativos en la temperatura de desnaturalización de la proteasa en presencia de este inhibidor competitivo y reversible, y análogo de la cadena lateral de la arginina que ocupa únicamente el subsitio de especificidad  $S_1$  de la proteinasa (ver figura 4.1C), sugiere que la ocupación de este subsitio no es suficiente para incrementar la termoestabilidad de la proteasa. Esta observación implicaría que prácticamente todo el incremento en la estabilidad térmica de la trombina resulta de interacciones con los subsitios  $S_2$  y  $S_4$  de la proteasa. Sin embargo, el impacto de la unión covalente de los residuos del sitio activo, His<sup>57</sup> y Ser<sup>195</sup> (Figura 4.1, en Resultados) parece ser muy importante en este sentido, ya que vinculan los dos lóbulos que conforman el dominio catalítico de la trombina, característica típica de las proteasa serínicas semejantes a tripsina [Richardson, 1981]. En este sentido, Privalov y colaboradores

reportaron un efecto estructural cooperativo de los dos lóbulos que conforman el dominio catalítico de la plasmina, donde determinaron el perfil termodinámico de estos lóbulos ( $T_m = 40.65$  y  $61.45$  °C, respectivamente), indicando la interrelación existente entre ellos [Novokhatny, Kudinov, *et al.*, 1984].

Por otro lado, nuestros resultados con las dos técnicas antes mencionadas, demuestran que la unión del extremo C-terminal de la hirudina incrementa la  $T_m$  de la proteasa entre aproximadamente  $1.5$  y  $3$  °C (de  $55.7$  a  $59.0$  °C; figura 4.3 y tabla 4.3 de Resultados), lo que demuestra un incremento en la estabilidad global de la trombina al ocuparse el exosito I de la misma. Es importante resaltar que los resultados de nuestros estudios revelan por primera vez un efecto sinérgico sobre la temperatura de desnaturalización al emplear simultáneamente dos ligandos, uno dirigido al sitio activo y otro al exosito I de la trombina. Este efecto sinérgico sobre la termoestabilidad de la proteinasa se evidenció al comparar los valores de  $T_m$  para la trombina libre con los de la proteinasa inhibida con FPR, Hir-C ó ambos ligandos (Tabla 5.1), permitiendo concluir que los dos ligandos generan cambios intramoleculares complementarios al modificar la estructura secundaria y terciaria de la trombina, confiriéndole mayor estabilidad estructural global al ocupar tanto los subsitios de especificidad  $S_4$ ,  $S_2$  y  $S_1$ , como el exosito I de la proteasa.

|                   | Trombina → | Trombina-Hir-C → | Trombina-FPR → | Trombina-FPR·Hir-C |
|-------------------|------------|------------------|----------------|--------------------|
| $T_m$ (°C)        | 55.7       | 59.0             | 79.8           | 83.9               |
| $\Delta T_m$ (°C) |            | (+ 3.3)          | (+ 24.1)       | (+ 28.2)           |

**Tabla 5.1 Incremento en la temperatura de desnaturalización de la trombina en presencia de ligandos.** Se presentan los valores de la temperatura de desnaturalización obtenidos en los ensayos de microcalorimetría diferencial ( $T_m$ ) y el incremento de la  $T_m$  con respecto al valor de trombina libre ( $\Delta T_m$ ). Nótese el efecto colaborador o sinérgico del FPR y la Hir-C.

Este efecto sinérgico aquí demostrado es consecuente con los cambios conformacionales de la trombina reportados por Huntington y colaboradores, los cuales demostraron mediante espectroscopía de RMN que tanto el FPR como la Hir-C estabilizan las resonancias de los residuos de la proteasa de forma global. En particular, estos investigadores observaron que la Hir-C, además de estabilizar la región del exosito I, también estabiliza parte de la estructura de barril- $\beta$  C-terminal de la proteasa [Lechtenberg, Johnson, *et al.*, 2010]. Es interesante destacar que nuestros resultados con trombina-PMSF evidencian una leve reducción en la temperatura de desnaturalización, lo que sugiere que la unión covalente del grupo sulfonilo a la Ser<sup>195</sup> es contraproducente para la termoestabilidad de la proteinasa. Estos

resultados apuntan al papel de puentes de hidrógeno con el grupo OH de la serina catalítica, o a la influencia negativa del grupo sulfonilo sobre el solvente que ocupa la hendidura del sitio activo.

Las observaciones presentadas anteriormente evidencian que el considerable incremento en la temperatura de desnaturalización de la trombina se explica principalmente por el efecto de las interacciones de ligandos, tales como el FPR o la Hir-C, que modifican la conformación en las estructuras secundaria y terciaria de la proteasa, y que le confieren mayor estabilidad termodinámica. Estos resultados son consistentes con la observación de reordenamientos generales de la estructura secundaria de la proteinasa monitorizados por dicroísmo circular [Silva Vde, Cargnelutti, *et al.*, 2011]; así como con la conexión entre el sitio activo y el exosito I propuesta por Komives y colaboradores a partir de estudios de intercambio de hidrógeno/deuterio mediante RMN de la trombina bovina [Croy, Koeppe, *et al.*, 2004].

Los resultados de microcalorimetría reportados en este trabajo son comparables con los presentados por otros investigadores, y en su conjunto permiten realizar un análisis global de la termodinámica de la (pro)trombina (Tabla 5.2 y Figura 5.1). En este sentido, la reducción del valor de  $T_m$  por la transición de protrombina a pretrombina-2 humana ( $\Delta T_m = -4.4$ ) se podría explicar principalmente por una mejor estabilidad del dominio catalítico debida a la pérdida de las interacciones entre el dominio K2 y el (pro)exosito II de la protrombina [Papaconstantinou, Gandhi, *et al.*, 2008]. A su vez, estos resultados permiten inferir que ligandos que se unen al exosito II podrían incrementar la estabilidad de la trombina, y por lo tanto el valor de  $T_m$  en una magnitud similar. Se ha reportado para el miniplasminógeno (un zimógeno de la plasmina conformado por el dominio K5 unido covalentemente al dominio catalítico mediante dos puentes de disulfuro), que la pérdida de este dominio *kringle* produce un incremento en la estabilidad de la proteína ( $T_m = 59.9$  vs.  $61.5$  °C;  $\Delta T_m = +1.6$  °C) (Novokhatny, 1984 #479). Sin embargo, en este caso, y a diferencia de la protrombina, el dominio tipo *kringle* no interacciona con un (pro)exosito de la proteasa serínica. Por otro lado, la activación de la pretrombina-2 a trombina activa conduce a un aumento de la termoestabilidad ( $\Delta T_m = +2.8$  °C), resultado sin duda de la estabilización del “dominio de activación” de la proteasa tras la inserción del extremo N-terminal, Ile<sup>16</sup>, en el bolsillo correspondiente (Ile<sup>16</sup> *pocket*) y la estabilización concomitante de la maquinaria catalítica.

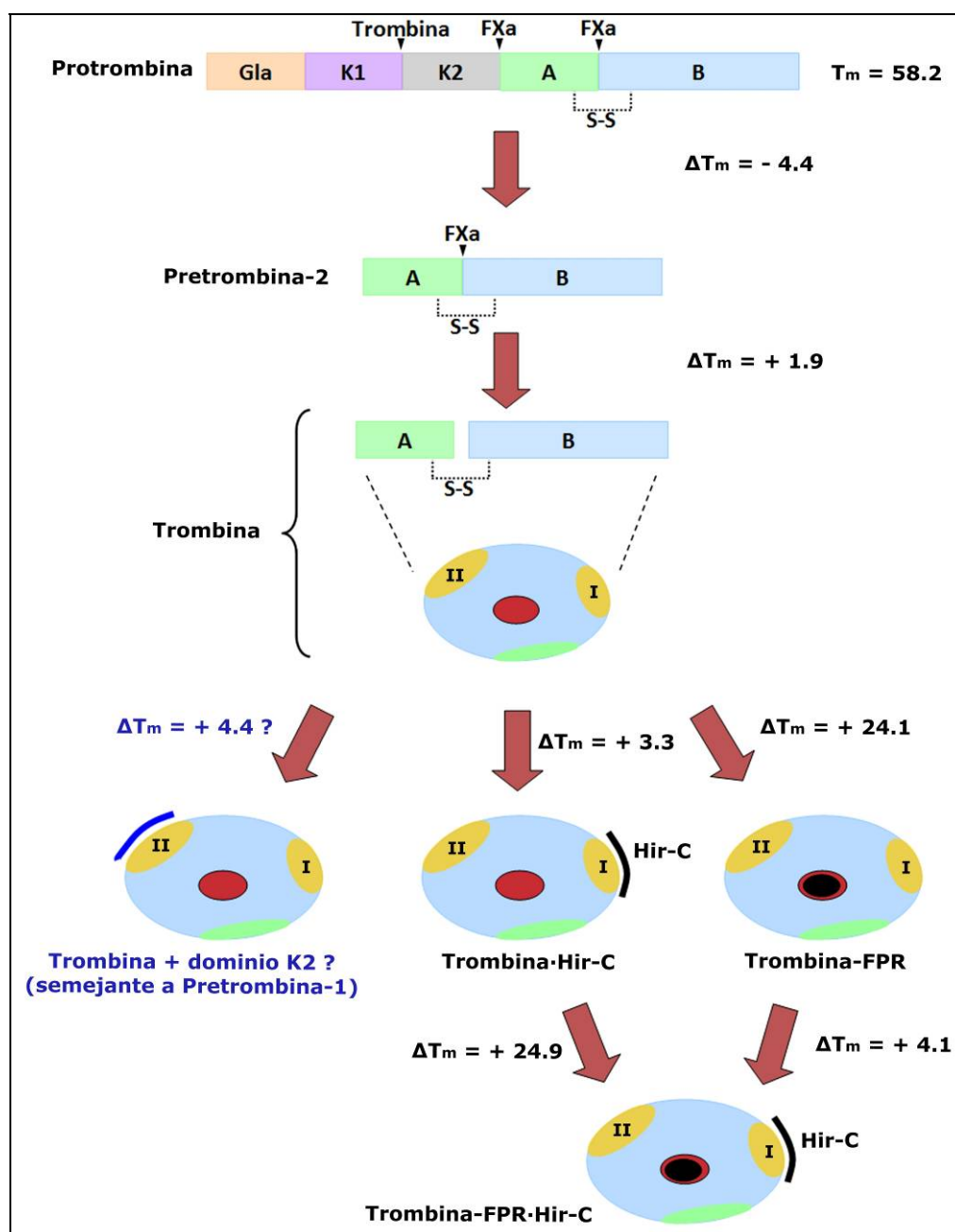
| Proteína           | Origen | Temperatura de desnaturalización (°C) | Referencia                                     |
|--------------------|--------|---------------------------------------|------------------------------------------------|
| Protrombina        | Humano | 58.2                                  | [Koepppe and Komives, 2006]                    |
| Pretrombina-2      |        | 53.8                                  | [Koepppe and Komives, 2006]                    |
| Trombina libre     |        | 55.7 <sup>a</sup> / 54.5 <sup>b</sup> | Este trabajo                                   |
|                    |        | 56.6                                  | [Koepppe and Komives, 2006]                    |
|                    |        | 58.0                                  | [Silva Vde, Cargnelutti, <i>et al.</i> , 2011] |
| Trombina·Hir-C     |        | 59.0 <sup>a</sup> / 56.0 <sup>b</sup> | Este trabajo                                   |
| Trombina-FPR       |        | 79.8 <sup>a</sup> /74.0 <sup>b</sup>  | Este trabajo                                   |
|                    |        | 74.0                                  | [Silva Vde, Cargnelutti, <i>et al.</i> , 2011] |
| Trombina-FPR·Hir-C |        | 83.9 <sup>a</sup> / 77.1 <sup>b</sup> | Este trabajo                                   |
| Trombina libre     | Bovino | 57.6                                  | [Croy, Koepppe, <i>et al.</i> , 2004]          |
| Trombina-FPR       |        | 79.0                                  | [Croy, Koepppe, <i>et al.</i> , 2004]          |

**Tabla 5.2 Temperatura de desnaturalización de la trombina (libre o inhibida) y sus formas zimógenas.** Se presentan los valores de  $T_m$  obtenidos en este trabajo de investigación (indicando con “a” los valores obtenidos mediante microcalorimetría y con “b” los de termofluorescencia diferencial) y los reportados en la literatura. Nótese el considerable incremento en la termoestabilidad de la trombina tras ser inhibida con FPR, demostrado en los diferentes estudios tanto de la proteinasa humana como bovina.

### 5.1.2 La ocupación del sitio activo de la trombina incrementa la estabilidad del exosito I a proteólisis limitada

Como se mencionó en el epígrafe 4.1.1, y aprovechando la presencia de residuos de arginina expuestos en el lazo 70-80 del exosito I de la trombina, evaluamos la accesibilidad de este lazo a la endoproteinasa Arg-C en la trombina libre y en la proteasa cuyo sitio activo está ocupado con benzamidina (bolsillo  $S_1$ ) o con FPR ( $S_4$ ,  $S_2$  y  $S_1$ ). Los resultados de estos experimentos demostraron inequívocamente que la trombina libre es más susceptible a proteólisis limitada en este lazo en presencia de la Arg-C, y la cadena pesada de la proteasa es degradada casi totalmente a las 4 h de reacción (Figura 4.2B). Por otro lado, la proteasa inhibida reversiblemente con benzamidina mostró un patrón de degradación más lento y gradual (Figura 4.2E). Experimentos esencialmente idénticos realizados con BSA nos permitieron comprobar que la benzamidina no inhibe a la Arg-C (Anexo 7), y que por lo tanto la degradación más lenta de la cadena pesada de la trombina·benzamidina se debe realmente a que la ocupación del subsitio  $S_1$  convierte a la trombina en un peor sustrato para la Arg-C. Finalmente, la proteasa inhibida irreversiblemente con FPR se mantuvo estable incluso luego de 8 h en presencia de Arg-C (Figura 4.2H). Cabe resaltar que los dos fragmentos de ~20 y ~10 kDa generados a partir de la cadena pesada de la trombina se producen por corte(s) tras los

residuos de arginina expuestos correspondientes a Arg<sup>75</sup>-Tyr<sup>76</sup> ó Arg<sup>77A</sup>-Asn<sup>78</sup> del lazo 70-80 del exosito I de la trombina.

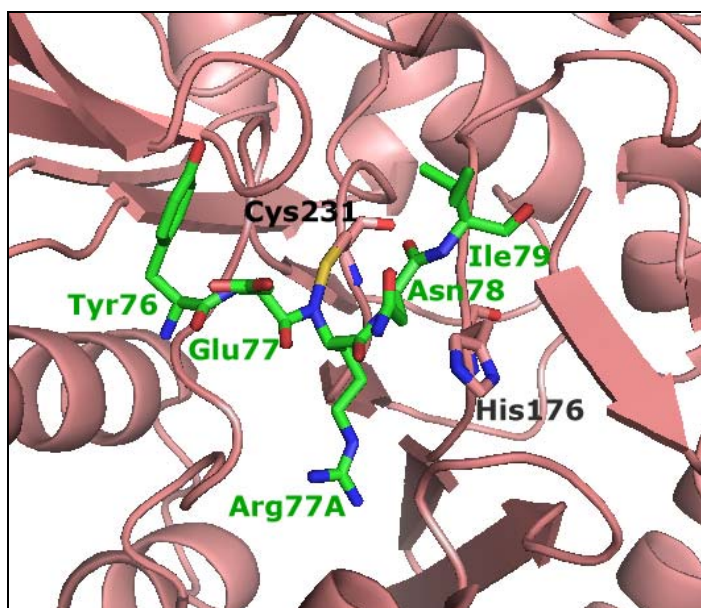


**Figura 5.1 Representación esquemática de los cambios estructurales y en la temperatura de desnaturalización entre la protrombina y la trombina estabilizada por ligandos dirigidos al sitio activo o a los exositos.** Se representan los dominios Gla, Kringle 1 y 2, y las cadenas ligera (A, en color verde) y pesada (B, en celeste) que forman el dominio catalítico. Los exosito I y II se representan con óvalos de color amarillo y el sitio activo con un óvalo de color rojo. Se indica la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ; en °C) de la protrombina y los cambios en la  $T_m$  ( $\Delta T_m$ ; en °C) de cada variante de trombina con respecto a la variante predecesora. Nótese i) que el corte de activación por el complejo protrombinasa resulta en un incremento de aproximadamente 2 °C en la  $T_m$ , ii) el incremento de más de 20 °C en la  $T_m$  de la trombina al ser inhibida con FPR y iii) el incremento en la  $T_m$  por efecto sinérgico al emplear FPR e el péptido C-terminal de la hirudina.

Estos experimentos de proteólisis limitada demuestran que el lazo 70-80 en la trombina libre es más accesible a la endoproteinasa Arg-C, y/o que es capaz de adaptarse más fácilmente al surco del sitio activo de la cisteín proteasa, mientras que en las moléculas de trombina cuyos sitios activos están ocupados por ligandos, el lazo 70-80 está menos expuesto a la endoproteinasa o es más rígido. Es decir, el incremento en la resistencia a proteólisis sugiere cambios conformacionales en la región correspondiente a este lazo y/o sus alrededores en la estructura 3D de la molécula de trombina en solución causados por la unión de ligandos, ya sea al subsitio  $S_1$  (benzamidina) o a los subsitios  $S_1$ - $S_4$  (FPR) del sitio activo de la proteasa. Para analizar el posible modo de interacción de los residuos del lazo 70-80 con la Arg-C, generamos un modelo 3D del dominio catalítico de esta proteasa, basado en su homóloga de *Parabacteroides merdae* (PDB: 3UWS) [Chen, Rawlings, *et al.*, 1998]. La inspección de este modelo, considerando también las preferencias por residuos en las posiciones  $P_4$ - $P_4'$  reportadas para la Arg-C, sugiere que el sitio de corte preferente corresponde al residuo de Arg<sup>77A</sup> del lazo, dado que los residuos que encajarían en los subsitios  $P_3$ - $P_1$  son reemplazados conservativamente con respecto a los reportados previamente para sustratos de Arg-C (<http://merops.sanger.ac.uk>, [Rawlings, Barrett, *et al.*, 2012, Igarashi, Eroshkin, *et al.*, 2007]). La proteólisis tras los residuos Arg<sup>73</sup> y Arg<sup>75</sup> es menos probable debido a que, en el caso de la Arg<sup>73</sup>, ésta se encuentra orientada hacia el cuerpo de la molécula de trombina y presenta impedimentos estéricos por los residuos Trp<sup>141</sup> y Pro<sup>152</sup> de la proteasa serínica, mientras que la Arg<sup>75</sup> presenta únicamente un residuo reemplazado conservativamente que encajaría en el subsitio  $P_3$ , según la información de sustratos reportados para la Arg-C [Igarashi, Eroshkin, *et al.*, 2007].

Sin embargo, la conformación extendida adoptada por los residuos Tyr<sup>76</sup>-Ile<sup>79</sup> de la trombina, en un hipotético complejo Michaelis-Menten con la endoproteasa Arg-C (Figura 5.2), difiere notablemente de la observada en las estructuras de la trombina inhibida con FPR (Por ejemplo, los valores de los ángulos  $\phi/\psi$  para el residuo Arg<sup>77A</sup> son  $-67.0^\circ/-48.8^\circ$  en la estructura de trombina-FPR [Bode, Turk, *et al.*, 1992], pero los valores correspondientes en el modelo del complejo con la Arg-C son de  $-105.6^\circ$  y  $-52.0^\circ$ , respectivamente). Finalmente, el dominio catalítico de la Arg-C podría colisionar con la cadena pesada de la trombina si el lazo 70-80 se pliega hacia el resto de la molécula de trombina, y por tanto la conformación idónea para el procesamiento de este lazo implicaría su proyección hacia el solvente. Estas observaciones,

aunque derivadas de modelos, refuerzan nuestra hipótesis de que el lazo 70-80 requiere de cambios conformacionales notables para ser reconocido como sustrato de la Arg-C -y de proteasas en general-, y que la conformación “digerible” debe ser flexible.



**Figura 5.2 Modelo de interacción entre residuos del lazo 70-80 del exosito I de la trombina libre con el sitio activo de la endoproteasa Arg-C.** El dominio catalítico de la Arg-C (color rosa) se basó en la estructura 3D de la cisteína proteasa homóloga 3UWS reportada previamente en el PDB [Chen, Rawlings, *et al.*, 1998], mientras que los residuos Tyr<sup>76</sup>-Ile<sup>79</sup> del lazo 70-80 de la trombina (color verde) se modelaron en el sitio activo de la endoproteasa a partir de la superposición de otra cisteína peptidasa inhibida con FPR, la Gingipaina R (PDB: 1CVR) [Eichinger, Beisel, *et al.*, 1999] [Código de colores: átomos de C en rosa ó verde, respectivamente, S en amarillo, N en azul y O en rojo]. Se representan con *sticks* los residuos catalíticos de la endoproteasa (His<sup>176</sup>, Cys<sup>231</sup>), y los residuos Tyr<sup>76</sup>-Ile<sup>79</sup> del exosito I de la trombina, correspondientes a las posiciones P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>'. Nótese que el residuo de corte más probable, la Arg<sup>77A</sup>, se modela en el bolsillo S<sub>1</sub> de la endoproteasa.

Como se mencionó más arriba, nuestros resultados concuerdan con reportes recientes que indican que la unión de FPR conduce a una estabilización general de las resonancias de los residuos de la proteasa. Los cambios conformacionales que se infieren de estos estudios de RMN afectan en particular, además del sitio activo, a regiones situadas en o alrededor del exosito I, los lazos 180 y 220, el barril- $\beta$  C-terminal, así como parte del barril- $\beta$  N-terminal en contacto con el exosito I de la proteasa [Lechtenberg, Johnson, *et al.*, 2010].

Por el contrario, se ha reportado que complejos de trombina con sus inhibidores fisiológicos de la clase de las serpinas (e.g. AT, HCII) reducen la afinidad de los ligandos por los exositos I y II debido a que provocan un desorden estructural en estas regiones [Bock, Olson, *et al.*, 1997, Fredenburgh, Stafford, *et al.*, 2001], e incrementan considerablemente la susceptibilidad a autólisis en residuos de arginina y lisina localizados en los mismos [Li, Johnson, *et al.*, 2010]. En este último trabajo se propone que, en el caso del exosito I, la pérdida de la

estructura ordenada del sitio activo, como consecuencia del mecanismo de interacción de las serpinas (debido a la extracción del residuo Asp<sup>194</sup> del bolsillo de activación de la proteasa), resulta en el consecuente desorden del exosito, y en un incremento de su susceptibilidad a autólisis. Estos resultados sugieren que el ordenamiento del exosito I es crítico para una mayor resistencia a la proteólisis, y fue comprobado por la reducción en el grado de autólisis del complejo trombina-serpina en presencia de Hir-C. En resumen, estos resultados, junto a los obtenidos en nuestros experimentos de proteólisis limitada con Arg-C, sugieren que el ordenamiento estructural del sitio activo estabiliza los exositos, reduciendo así su susceptibilidad a proteólisis.

### **5.1.3 Evidencia cristalográfica de la conexión sitio activo-exosito I: reducción de la flexibilidad del lazo 70-80 de la trombina inhibida con FPR**

El análisis de las estructuras 3D cristalinas de la trombina resueltas como parte de esta investigación (Anexo 10), así como su comparación con otras estructuras depositadas en el PDB, sugiere que las moléculas de la proteinasa presentan cambios conformacionales menores. En general, la presencia o no de densidad electrónica correspondiente a algunos de sus lazos más flexibles, como el lazo 70-80 del exosito I ó el lazo  $\gamma$ , se debe a los contactos entre las moléculas de trombina dentro de multímeros, o con moléculas relacionadas cristalográficamente. Además de las interacciones intermoleculares/cristalográficas que estabilizan estos lazos y permiten así su resolución estructural, y como hemos demostrado más arriba mediante estudios de proteólisis limitada, otro factor importante para la estabilización de estas regiones es la ocupación del sitio activo con ligandos específicos. Particularmente, la comparación cuidadosa de las estructuras de trombina libre y de trombina-FPR (refinadas a 1.7 Å), así como de otras estructuras de la proteinasa no reportadas previamente en la literatura (refinadas a 2.3 y 2.7 Å) (Figuras 4.4 a 4.8) nos permitieron analizar detalladamente los exositos de la trombina. En particular debemos destacar que los valores del factor B correspondientes a los residuos del lazo 70-80 son significativamente más altos en la trombina libre (33.78 Å<sup>2</sup>, contra un valor promedio para toda la molécula de 20.11 Å<sup>2</sup>). Estos valores contrastan con los correspondientes a la proteasa inhibida irreversiblemente con FPR (20.31 y 23.05 Å<sup>2</sup>, respectivamente), lo que sugiere una rigidez de este lazo equivalente a la del resto de la molécula de trombina.



#### 5.1.4 Evidencia del dinamismo conformacional de la trombina modulado por sus ligandos

---

Las evidencias experimentales discutidas en los epígrafes anteriores demuestran que la trombina presenta un notable grado de flexibilidad en regiones que son importantes para su actividad, particularmente en el lazo central del exosito I, el lazo 70-80. Además, en presencia de diferentes ligandos esta flexibilidad se reduce, lo cual conduce a un incremento considerable en su estabilidad térmica. Estos resultados apoyan el modelo recientemente propuesto, que establece que la trombina es conformacionalmente dinámica y poco activa, pero que la unión de ligandos disminuye su flexibilidad e incrementa su actividad [Huntington, 2012, Lechtenberg, Freund, *et al.*, 2012, Silva Vde, Cargnelutti, *et al.*, 2011].

Además, nuestros resultados demuestran la existencia de una conexión profunda entre el sitio activo y el exosito I, evidenciada por el hecho de que ligandos dirigidos al sitio activo ejercen cambios conformacionales que estabilizan considerablemente a la molécula de trombina en general, y en particular al exosito I. Otros grupos han presentado evidencia adicional de que las interacciones con los exositos modulan de forma decisiva la plasticidad conformacional de la trombina, contribuyendo así a la selección de ligandos específicos. Por ejemplo, utilizando el péptido C-terminal de la hirudina y/o aptámeros ADN dirigidos al exosito I se evidenció una reducción en la afinidad de ligandos específicos del exosito II. De forma alternativa, empleando análogos del extremo C-terminal de la cadena  $\gamma'$  del fibrinógeno y/o heparina dirigidos al exosito II se evidenció también una reducción de la unión de ligandos específicos al exosito I de la proteinasa, sugiriendo cambios conformacionales bidireccionales entre los exositos de la trombina [Petrera, Stafford, *et al.*, 2009]. Por otra parte, las investigaciones mediante espectroscopía de RMN, presentadas por Huntington y colaboradores sugieren una conexión entre el exosito I y el sitio activo de la proteasa a través de dos posibles mecanismos generados a partir de la inserción de la cadena lateral del residuo Phe<sup>56H</sup> del péptido C-terminal de la hirudina en el exosito I. El primero, mediante enlaces de puente de hidrógeno e interacciones entre las cadenas laterales, propone que la Phe<sup>56H</sup> de la Hir-C estabiliza el exosito I que está en contacto directo con la región C-terminal del lazo de autólisis y con las dos láminas- $\beta$  (residuos 135-140 y 156-161) que estabilizan a su vez el lazo 180 de la proteasa. El segundo mecanismo, a través de un enlace disulfuro, propone que el residuo Phe<sup>56H</sup> de la Hir-C estabiliza la lámina- $\beta$  donde se encuentra la Cys<sup>42</sup> formando un enlace

disulfuro con la Cys<sup>58</sup>, estabilizando finalmente al residuo His<sup>57</sup> del sitio catalítico de la proteasa [Lechtenberg, Johnson, *et al.*, 2010].

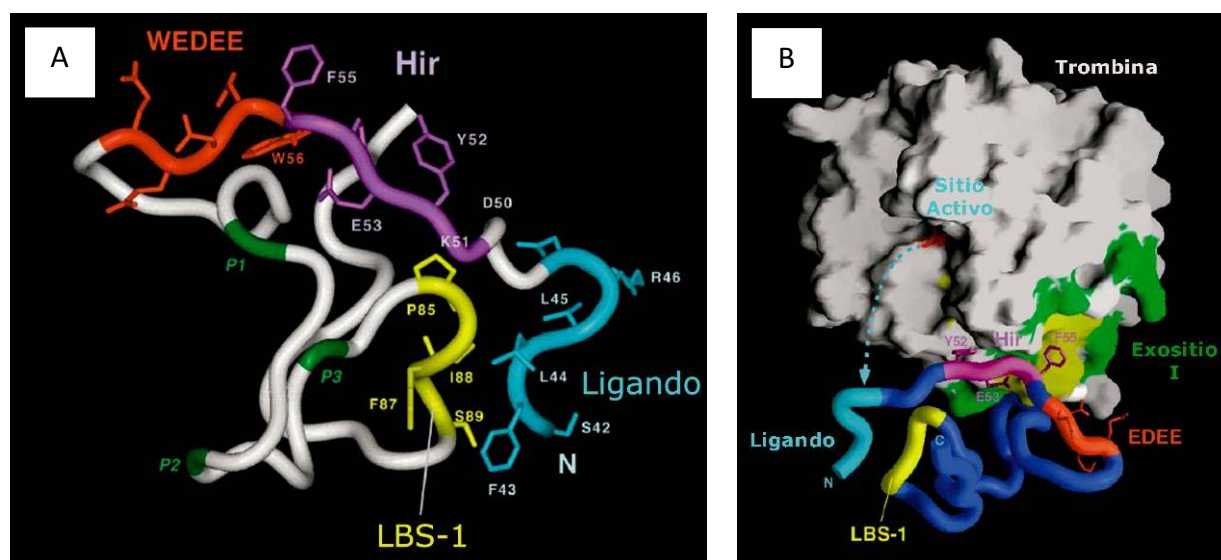
Como conclusión, nuestros resultados experimentales, unido a los trabajos presentados por estos grupos, demuestran el elevado dinamismo molecular de la trombina y el importante papel que desempeñan los exositios para el reconocimiento de sus ligandos específicos. Dado que la unión de ligandos al exosito I se da inicialmente a través de interacciones electrostáticas (las cuales no requieren una conformación rígida de la trombina) y posteriormente mediante interacciones hidrofóbicas [Myles, Le Bonniec, *et al.*, 2001] que estabilizan el exosito I y otras regiones tales como el barril- $\beta$  C-terminal de la proteasa [Lechtenberg, Johnson, *et al.*, 2010], Huntington y colaboradores proponen que la ocupación del exosito I incrementa la estabilidad del bolsillo S<sub>1</sub> y del sitio activo, lo cual podría favorecer los valores de Km y kcat. Esta interrelación explica por qué la mayoría de sustratos fisiológicos de la trombina tales como el fibrinógeno, el PAR1, los factores V y VIII, entre otros, han de unirse inicialmente al exosito I para estabilizar el sitio activo para el subsecuente procesamiento del sustrato por la triada catalítica de la proteasa.

## 5.2 BASES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN DE LA TROMBINA CON SUS SUSTRATOS

### 5.2.1 Bases moleculares de la interacción del receptor PAR1 con su proteasa activadora, la trombina

El receptor PAR1 pertenece a un subgrupo único dentro de la extensa familia de los receptores de siete dominios de transmembrana (7TM) ó receptores acoplados a proteínas G (GPCR), ya que contienen su propio ligando “enmascarado” dentro de la región N-terminal extracelular. Este ligando es expuesto luego del corte proteolítico de un enlace peptídico específico, lo que conduce a la activación del receptor. En este sentido, se ha determinado la importancia de las interacciones con el exosito I de la trombina para el reconocimiento y activación de PAR1 [Mathews, Padmanabhan, *et al.*, 1994, Seeley, Covic, *et al.*, 2003, Gandhi, Chen, *et al.*, 2008]. En el momento de inicial esta investigación, la estructura por RMN en solución del dominio extracelular del PAR1 humano (residuos Ala<sup>28</sup>-homoSer<sup>103</sup>) había sido reportada [Seeley, Covic, *et al.*, 2003], sin embargo, las coordenadas correspondientes no han sido depositadas en el PDB. Aun así, a partir de la información y las figuras presentadas en este

artículo se deduce que, además de la región homóloga al péptido C-terminal de la hirudina en PAR1, otras regiones del receptor contactan con la trombina e involucran a una región de la proteasa que va más allá del exosito I (Figura 5.3). Alternativamente, es posible que, o bien, el ectodominio del receptor presenta una estructura marcadamente diferente antes de ser activado, o que la secuencia semejante a la hirudina es “extraída” del dominio globular en presencia de la trombina. Al comparar lo reportado por Kuliopulos y colaboradores (Figura 5.3) [Seeley, Covic, *et al.*, 2003] con la estructura cristalina reportada por Di Cera y colaboradores (Figura 1.10) [Gandhi, Chen, *et al.*, 2010], y con nuestra estructura de PAR1 (Figura 4.26), se puede confirmar que en las tres investigaciones los residuos similares a la hirudina, particularmente la Tyr<sup>52</sup> y la Phe<sup>55</sup> están orientados hacia el cuerpo de la molécula de trombina. También hay concordancia al comparar los residuos Phe<sup>43</sup>-Leu<sup>44</sup> en las dos primeras estructuras los cuales se orientan hacia el exterior, sin embargo, parece haber discrepancias en los residuos Leu<sup>45</sup>-Asp<sup>50</sup>, los cuales en la estructura en solución (RMN) parecen estar orientados hacia el cuerpo de la proteasa, mientras que en la estructura reportada por Di Cera están orientados hacia el exterior de la proteinasa formando un lazo con cierto grado de desorden (ver Figura 4.26). Estas diferencias sugieren que el proceso de activación requiere de reordenamientos estructurales profundos, y/o de interacciones adicionales de la trombina con PAR1.



**Figura 5.3 Estructura 3D del ectodominio de PAR1 en interacción con la trombina.** **A.** Estructura 3D del receptor PAR1 a partir de los residuos Ala<sup>28</sup>-homoSer<sup>103</sup> resaltando en diferentes colores los residuos correspondientes al ligando (celeste), a la región similar a hirudina (Hir/WEDEE, morado/naranja), y el sitio de unión del ligando (LBS-1, amarillo). **B.** Modelo del complejo trombina-ectodominio de PAR1. Dada la ausencia de las coordenadas de esta estructura, a partir del modelo propuesto por [Seeley, Covic, *et al.*, 2003] es concebible pensar que otras regiones del receptor podrían interactuar con la proteasa (color gris). Por ejemplo, regiones del receptor entre la secuencia similar a hirudina y el LBS-1 podrían estar interactuando con la trombina. Figura modificada de [Seeley, Covic, *et al.*, 2003].

### 5.2.1.1 Sobreexpresión de variantes del dominio extracelular de PAR1

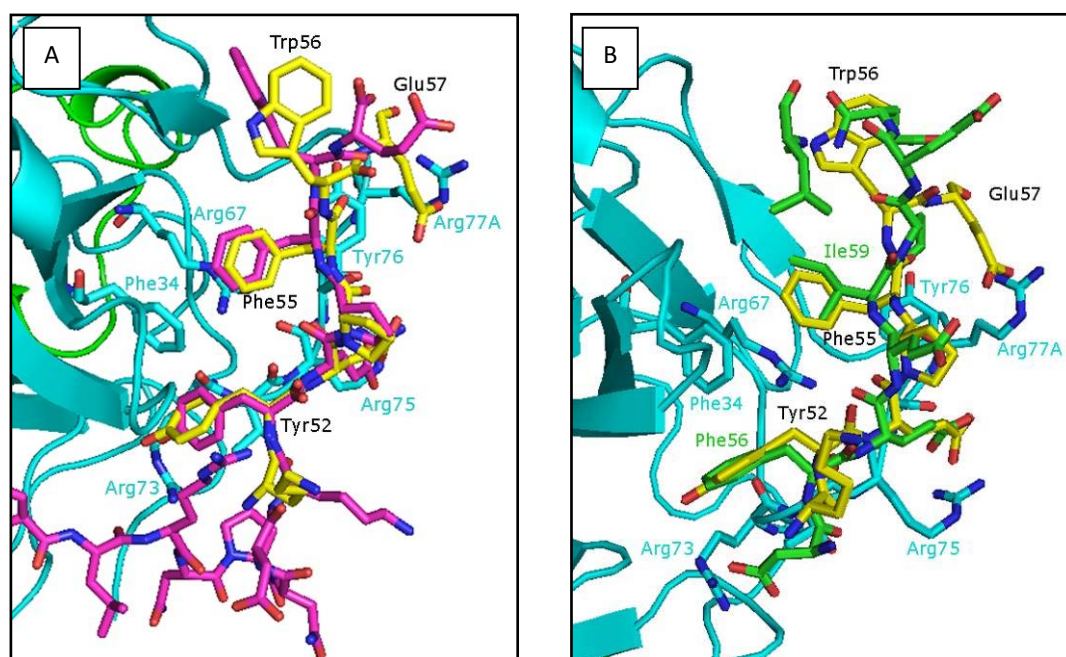
Como hemos mencionado anteriormente la activación de PAR1 en plaquetas mediada por la trombina es un elemento muy importante de la respuesta procoagulante. Para tratar de entender ese mecanismo de activación se clonaron y sobreexpresaron dos formas recombinantes del dominio extracelular de PAR1, una que corresponde al fragmento del receptor luego del corte de activación (residuos Ser<sup>42</sup>-Thr<sup>102</sup>, PAR1<sub>S</sub>), y la otra extendida N-terminalmente para incluir además los residuos Thr<sup>37</sup>-Arg<sup>41</sup> esenciales para la interacción del receptor con el sitio activo de la proteinasa (PAR1<sub>L</sub>). Aunque la optimización del gen sintético y la expresión de las variantes del PAR1 se realizaron de forma muy similar, se evidenciaron diferencias significativas en la solubilidad de los dominios recombinantes, donde PAR1<sub>L</sub> se logró extraer con buen rendimiento en la fracción soluble de B-PER y en la fracción de 2 M de urea, mientras que PAR1<sub>S</sub> se extrajo en 4 y 6 M de urea, en ambos casos a partir de la sobreexpresión en células de *E. coli* BL21(DE3). Dado que la única diferencia entre las dos variantes recombinantes utilizadas en nuestros estudios radica en la presencia o no de los residuos N-terminales T<sup>37</sup>LDPR<sup>41</sup> (subsitos P<sub>5</sub>-P<sub>1</sub>) que preceden al sitio de corte y activación por la trombina, al analizar las diferencias de solubilidad es concebible pensar que el dominio extracelular de PAR1 adopta conformaciones bien diferentes antes y después del corte de activación. En este sentido, se ha reportado diferencias de solubilidad en el dominio extracelular de PAR1 Ala<sup>26</sup>-homoSer<sup>103</sup>, en donde el dominio extracelular de PAR1 luego del corte proteolítico Arg<sup>41</sup>-Ser<sup>42</sup> resulta en la variante Ser<sup>42</sup>-homoSer<sup>103</sup> con un grado mucho mayor de solubilidad [Seeley, Covic, *et al.*, 2003]. Aunque este grupo observó que la variante más corta presentaba una mayor solubilidad, es factible pensar que las dos variantes utilizadas en nuestra investigación (PAR1<sub>L</sub>: Thr<sup>37</sup>-Thr<sup>102</sup> y PAR1<sub>S</sub>: Ser<sup>42</sup>-Thr<sup>102</sup>) presentaran diferencias de solubilidad debido a la estructura de los residuos iniciales y finales del dominio sobreexpresado. Lo que es evidente en ambos casos, es que existen diferencias de solubilidad entre la forma del dominio extracelular de PAR1 antes y después del corte de activación, por lo que la hipótesis de las posibles dos conformaciones del receptor son válidas, de ahí la importancia de obtener la estructura tridimensional de los complejos entre la trombina y las dos variantes de PAR1.

### 5.2.1.2 La región del dominio extracelular de PAR1 semejante al extremo C-terminal de la hirudina interacciona con el exosítio I de la trombina

En nuestros ensayos de cristalización iniciales de la trombina con el dominio extracelular de PAR1 se obtuvieron cristales en diferentes condiciones de cristalización (Anexo 9). Sin embargo, como se mencionó en el epígrafe 4.2.4 de Resultados, la inspección de los mapas de densidad electrónica de las estructuras tridimensionales resueltas por reemplazamiento molecular revelaron densidad para la molécula de trombina y no así para el fragmento recombinante del receptor. Por tanto, y para favorecer la formación del complejo binario, el residuo P<sub>1</sub> (Arg<sup>41</sup>) en la forma PAR1<sub>L</sub> fue mutado por glutamina, y los ensayos de cristalización repetidos. Esta estrategia permitió obtener rápidamente cristales del complejo trombina·PAR1<sub>L</sub>, que difractaron a una resolución media (~ 3.0 Å), y los cuales permitieron resolver la estructura 3D del complejo. El análisis estructural permitió visualizar perfectamente los residuos Tyr<sup>52</sup>-Glu<sup>57</sup> del receptor definidos por densidad electrónica. Esta región similar al extremo C-terminal de la hirudina es el elemento esencial que regula la interacción con el exosítio I de la proteasa mediante interacciones polares e hidrofóbicas (Figura 5.4A).

Aunque las interacciones electrostáticas parecen orientar preferentemente a PAR1 hacia el exosítio I de la trombina, este trabajo estructural demuestra que los contactos más fuertes con los residuos de la proteasa se establecen con las cadenas laterales aromáticas o alifáticas del receptor, especialmente la de los residuos Tyr<sup>52</sup> y Phe<sup>55</sup>. Esta preeminencia de las interacciones no polares ha sido también reconocida en la formación de los complejos de la trombina con inhibidores (e.g. hirudina, [Rydel, Ravichandran, *et al.*, 1990, Liu, Brustad, *et al.*, 2007]), sustratos (FV, Corral-Rodriguez, 2011 #312}) y receptores (trombomodulina, [Fuentes-Prior, Iwanaga, *et al.*, 2000]), salvando las diferencias existentes entre ellos. Como es el caso de la Hir-C (Phe<sup>56H</sup>) y el FV (Phe<sup>668</sup>), la cadena lateral de la Tyr<sup>52</sup> de PAR1 está completamente anclada en el exosítio I de la trombina, ocupando un bolsillo hidrofóbico formado por átomos tanto de la cadena principal como de las cadenas laterales de los residuos Phe<sup>34</sup>, Leu<sup>40</sup>, Arg<sup>67</sup>, Arg<sup>73</sup> y Thr<sup>74</sup>. Adicionalmente, el residuo Phe<sup>55</sup> del receptor presenta residuos topológicamente equivalentes en la Hir-C (Ile<sup>59H</sup>), el FV (Pro<sup>671</sup>) y la trombomodulina (Ile<sup>414</sup>) que cumplen un papel fundamental en la interacción con el exosítio I mediante interacciones de Van der Waals. En el caso de la Phe<sup>55</sup> de PAR1 las interacciones se llevan a cabo mediante el anillo bencénico y el grupo carbonilo, con el grupo guanidinio de la Arg<sup>67</sup> y con el anillo fenólico de la Tyr<sup>76</sup> de la

proteasa, respectivamente. Por otro lado, con la hirudina, se ha observado que la sustitución de la Phe<sup>56H</sup> por otros residuos aromáticos no reduce significativamente la constante de inhibición, mientras que su sustitución por residuos de cadena lateral ramificada (Ile, Val o Thr) resulta en un aumento de la constante de inhibición de 30, 60 ó 115 veces, respectivamente [Betz, Hofsteenge, *et al.*, 1991]. De manera similar, el cambio de la Phe<sup>56H</sup> o la Ile<sup>59H</sup> por glicina, en dos potentes hirudomiméticos (P741 y P740), disminuyen casi 500 y 175 veces su capacidad inhibidora comparada con el inhibidor sin modificar, respectivamente [Cheng, Slon-Usakiewicz, *et al.*, 1996]. Estas observaciones respaldan la importancia de los residuos de Tyr<sup>52</sup> y Phe<sup>55</sup> del dominio extracelular de PAR1 en la interacción del receptor con la trombina, dada la equivalencia topológica de las cadenas laterales con los residuos Phe<sup>56H</sup> e Ile<sup>59H</sup> de la hirudina (ver Figura 5.4B) y explican la alta afinidad del receptor por la proteasa [Ayala, Cantwell, *et al.*, 2001].

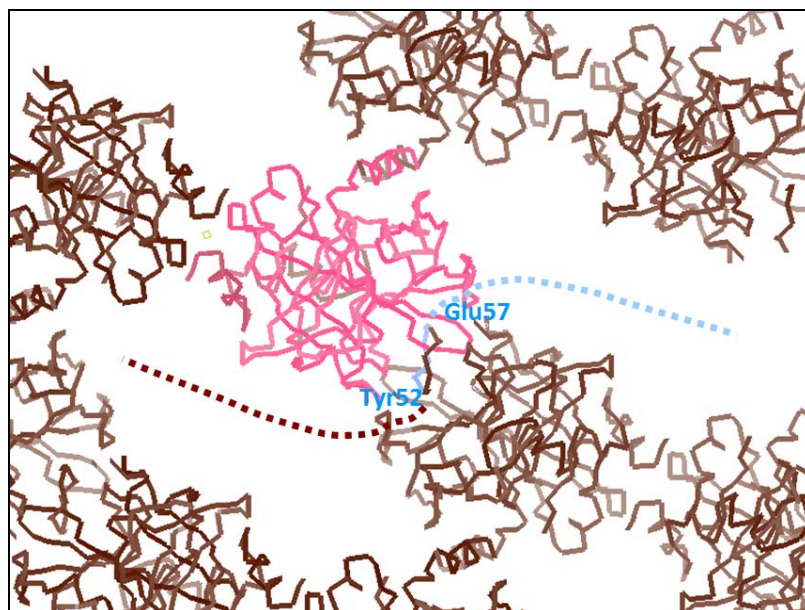


**Figura 5.4 Similitudes y diferencias entre la estructura del complejo trombina-PAR1 resuelta en este trabajo con la estructura presentada por Gandhi y colaboradores (A) y con el complejo trombina-Hir-C (B).** Los átomos de carbón de la estructura resuelta de PAR1 en este trabajo se representan en color amarillo, mientras que la molécula de trombina se presenta en color turquesa, así como algunos residuos importantes en las interacciones del exosito I en *sticks*. **A.** Superposición de la estructura de PAR1 presentada por [Gandhi, Chen, *et al.*, 2010] [PDB: 3LU9] (color magenta). Se evidencia que las dos estructuras resueltas presentan un ordenamiento molecular similar entre los residuos del PAR1 que interaccionan con el exosito I de la proteasa, con leves diferencias en el extremo C-terminal. Nótese la posición del residuo de Tyr<sup>52</sup> completamente anclado en el bolsillo hidrofóbico del exosito I y las interacciones entre la Phe<sup>55</sup> y la Arg<sup>67</sup> de la proteasa. **B.** Superposición de la estructura de Hir-C (color verde) [PDB: 2JH0] [Rydel, Ravichandran, *et al.*, 1990]. Se evidencia la importancia de los residuos Tyr<sup>52</sup> y Phe<sup>55</sup> de PAR1 con los residuos topológicamente equivalentes Phe<sup>56H</sup> e Ile<sup>59H</sup> en la Hir-C que explican la alta afinidad de estos ligandos por la trombina.

Mientras nuestras investigaciones se encontraban en marcha, el grupo de Di Cera reportó la estructura cristalina de un complejo formado entre una variante inactiva de la trombina (Ser195Ala) y un fragmento soluble del dominio extracelular de PAR1, Ala<sup>33</sup>-Glu<sup>57</sup>, refinada a 1.8 Å (Figura 1.10; epígrafe 1.6.2) [Gandhi, Chen, *et al.*, 2010]. La comparación con nuestra estructura evidencia que los residuos entre la Tyr<sup>52</sup> y la Phe<sup>55</sup> adoptan conformaciones muy similares en contacto con el exosito I de la trombina (Figura 5.4A), mientras que los residuos Trp<sup>56</sup> y Glu<sup>57</sup> difieren notablemente entre ambas estructuras. Dejando a un lado las resoluciones a las que fueron resueltos ambos complejos, estas diferencias parecen reflejar en nuestro caso una conformación más cercana a la fisiológica en la que los residuos más allá del Glu<sup>57</sup> del receptor se desvían de la molécula de trombina. La inspección del empaquetamiento de las moléculas del complejo en el cristal evidenció un espacio significativo entre moléculas del complejo vecinas, que se sitúa hacia la parte “superior” del exosito I y que permitiría acomodar perfectamente los residuos Asp<sup>58</sup>-Thr<sup>102</sup> no definidos por densidad electrónica en nuestra estructura. Por tanto, la ausencia de densidad electrónica para el resto de los residuos del dominio extracelular de PAR1 se debe a la flexibilidad de los mismos, y no a la proteólisis del receptor (Figura 5.5). Lamentablemente, no es posible determinar si todo el segmento 58-102 está intrínsecamente desordenado en el complejo con la trombina, o si contiene un pequeño dominio globular unido a la región semejante a la hirudina por un conector flexible.

Aun con la información de las estructuras de estos complejos trombina·receptor, el mecanismo molecular por el cual el receptor PAR1 internaliza la señal a las plaquetas es todavía sujeto de estudio [Gandhi, Chen, *et al.*, 2011]. Se ha propuesto que el receptor presenta una conformación “tensa” o en forma de “S”, y que una vez es activado por proteólisis limitada en la Arg<sup>41</sup>-Ser<sup>42</sup>, el nuevo extremo N-terminal (<sup>42</sup>SFLLRN<sup>48</sup>) es expulsado del sitio activo de la proteinasa para unirse al LBS-1 (ver Figura 5.3). Sin embargo, este mecanismo sigue sin dilucidarse del todo debido a que en la estructura presentada por el grupo de Di Cera la región entre el ligando y la secuencia similar a hirudina en PAR1 se encuentra mayoritariamente desordenada y la estructura resuelta mediante RMN por Seeley y colaboradores no se depositó en el PDB [Seeley, Covic, *et al.*, 2003].





**Figura 5.5 Ordenamiento de las moléculas del complejo trombina-PAR1 (Thr<sup>37</sup>-Thr<sup>102</sup>) en el cristal.** El complejo trombina-PAR1 se presenta en la unidad asimétrica de color rosa y celeste, respectivamente, mientras que las moléculas vecinas en color café. Se indica la orientación de N- a C-terminal de los residuos Tyr<sup>52</sup> y Glu<sup>57</sup> del receptor. El análisis del empaquetamiento de las moléculas del complejo evidenció un espacio significativo entre los monómeros en el cristal, que podría ser ocupado por los residuos 58-102 del dominio extracelular de PAR1 (representados esquemáticamente con una línea punteada) sin impedimentos estéricos. Esta observación sugiere que la ausencia de densidad electrónica adicional se debe a la flexibilidad intrínseca de estos residuos. Nótese que también se representa con una línea punteada café la posible orientación del dominio del receptor de la molécula vecina.

## 5.2.2 Bases moleculares de la interacción del FVIII con su proteasa activadora, la trombina

### 5.2.2.1 Estrategias para determinar las bases moleculares de la interacción del FVIII con la trombina: RMN de proteínas en solución y cristalografía de rayos X

#### 5.2.2.1.1 Sobreexpresión de los conectores ácidos interdominios del FVIII

Como hemos mencionado en los epígrafes 1.4 y 1.5, la activación del FVIII mediada por la trombina es fundamental para los procesos procoagulantes, de ahí la importancia de estudiar las interacciones trombina-FVIII. Resultados publicados recientemente por nuestro grupo sobre la interacción de los residuos Glu<sup>666</sup>-Glu<sup>672</sup> del conector a2 del FV con el exosito I de la trombina [Corral-Rodriguez, Bock, *et al.*, 2011], evidencian la importancia de regiones ricas en residuos ácidos y aromáticos en estas interacciones. Por otra parte, otros investigadores han reportado que los residuos ácidos Asp<sup>392</sup> y Asp<sup>394</sup> del dominio globular A2 [Nogami, Zhou, *et al.*, 2005] o Glu<sup>720</sup>-Asp<sup>725</sup> del conector de los dominios A2-B [Newell and Fay, 2008] son importantes para la activación del FVIII mediada por la trombina. Finalmente, en otros estudios



se ha reportado que los residuos Met<sup>337</sup>-Arg<sup>372</sup> del conector FVIIIa1, particularmente el triplete de residuos de ácido aspártico 361-363, interaccionan con el FX [Nogami, Lapan, *et al.*, 2004]. Estas informaciones previas, junto con la característica de que cada uno de los conectores interdominios del FVIII (FVIIIa1, FVIIIa2 y FVIIIa3) contienen regiones ricas en residuos ácidos que les confieren cargas netas negativas, sugieren que estos conectores interaccionan con los exositios básicos I y II de la trombina para presentar los sitios de corte y activación del cofactor al centro activo de la proteasa.

Estas observaciones nos llevaron a estudiar la formación de complejos de los conectores ácidos interdominios del FVIII con la trombina y el FX. Para cumplir este objetivo se clonaron, sobreexpresaron y purificaron los tres conectores ácidos interdominios del FVIII, así como mutantes puntuales de los mismos. Aunque los constructos iniciales utilizados en estos estudios se optimizaron de forma similar, se observaron diferencias significativas en la solubilidad de los fragmentos recombinantes. Por ejemplo, los conectores a1 y a3 se lograron extraer con buen rendimiento en la fracción soluble a partir de la sobreexpresión en células de *E. coli*, mientras que el FVIIIa2 se extrajo en tampones conteniendo 4-6 M de urea. Probablemente este fragmento recombinante tienda a agregar debido a su menor porcentaje de residuos polares (38% vs 45/46%). Estos resultados de expresión y purificación, unidos a lo reportado recientemente por nuestro grupo con relación a los dominios topológicamente equivalentes del factor V, FVa2 y FVa3 [Corral-Rodriguez, Bock, *et al.*, 2011], confirman que es posible expresar de forma heteróloga estos fragmentos de los factores de la coagulación, en cantidades y con un nivel de pureza adecuado para estudios biofísicos. Además, en este trabajo de investigación se demostró por primera vez la posibilidad de sobreexpresar el conector FVIIIa1 marcado en medio mínimo M9 obteniéndose, para estudios de RMN, a través de un procedimiento relativamente sencillo, de costo-beneficio favorable, y con un buen rendimiento en la fracción soluble. Esto nos permitió planificar una serie de ensayos de RMN para evaluar las interacciones del FVIIIa1 con la trombina y el FX. En experimentos preliminares se determinó que a 5 °C y a una concentración de 200 µM el fragmento recombinante se comporta como una especie monodispersa y permite obtener los espectros de resonancia con una distribución apropiada para la asignación de los residuos correspondientes (discutido más adelante). Estos resultados abren la puerta, al estudio de las interacciones entre los conectores FVIIIa2 y FVIIIa3

y la trombina, así como de regiones ácidas no estructuradas de otras proteínas mediante experimentos de RMN.

Es de resaltar que en experimentos de sobreexpresión de los conectores FVIIIa1 y FVIIIa3 en un medio nutritivo (LB), se detectaron no solo formas con las masas moleculares esperadas, sino también especies con un incremento de masa de ~80 Da por espectrometría de masas. Esta desviación puede ser explicada por la sulfatación (80.0643 Da) ó fosforilación (79.9799 Da) de un único residuo en el fragmento recombinante. Como se mencionó en el epígrafe de Resultados, las herramientas *Sulfinator* y *NetPhos* de ExPASy predicen que dentro de las regiones de los conectores interdominios A1-A2 y B-A3 del FVIII humano, los residuos más probables de sulfatación y fosforilación son la Tyr<sup>346</sup> y la Tyr<sup>1664</sup>, respectivamente. Aunque se conoce poco sobre las sulfotransferasas de *E. coli*, es de destacar que Glockshuber y colaboradores reportaron la presencia de una arilsulfotransferasa en cepas uropatogénicas de *E. coli*, la cual puede transferir grupos sulfato a grupos fenólicos mediante un mecanismo diferente a los empleados por enzimas de eucariotas (sin requerir del donador del grupo sulfurilo, PAPS) [Malojcic, Owen, *et al.*, 2008]. El proceso de fosforilación en *E. coli* es mejor conocido [Vincent, Doublet, *et al.*, 1999, Vincent, Duclos, *et al.*, 2000, Enami and Ishihama, 1984, Rosen, Becher, *et al.*, 2004]. Aunque la fosforilación de los fragmentos del FVIII parece la modificación más probable, cabe destacar que la sulfatación de los residuos de Tyr<sup>346</sup> (FVIIIa1) y Tyr<sup>1664/1680</sup> (FVIIIa3) se ha reportado como necesaria para un eficiente corte de activación del FVIII humano en las posiciones Arg<sup>372</sup> y Arg<sup>1689</sup> por la trombina [Pittman, Wang, *et al.*, 1992, Michnick, Pittman, *et al.*, 1994]. También es interesante señalar que al sobreexpresar el FVIIIa1 en medio mínimo M9 sólo se obtuvo el fragmento recombinante correspondiente a la masa molecular esperada (teórica), lo que indicaría que la modificación postraducciona putativa no ocurre en condiciones nutritivas reducidas para las bacterias.

#### **5.2.2.1.2 Búsqueda de condiciones de cristalización de los conectores FVIIIa1 y FVIIIa3 unidos a la trombina**

Nuestros resultados previos con el conector FVa2 [Corral-Rodriguez, Bock, *et al.*, 2011] y los experimentos de *band shift* de los conectores FVIIIa1 y FVIIIa3, que confirmaron la interacción con la trombina, nos motivaron a buscar condiciones de cristalización de complejos de estos fragmentos del FVIII con la proteinasa (ver tabla 4.12 y anexo 10), con el objetivo de resolver las estructuras 3D de dichos complejos. Sin embargo, luego de procesar y resolver las

estructuras 3D de un gran número de cristales obtenidos según lo descrito en el anexo 10, se evidenció densidad electrónica sólo para la molécula de trombina y no para los conectores FVIIIa1 ó FVIIIa3. Por ello se optó por modular el sitio de corte y activación de los conectores para favorecer la forma acomplejada de la trombina con el sustrato. Se realizaron mutaciones dirigidas en las posiciones  $P_1$  y  $P_1'$  sobre los residuos de arginina y serina, los cuales fueron reemplazados por glutamina y prolina, respectivamente. Dado que la glutamina tiene una cadena lateral no cargada y la prolina dificulta a las proteasas serínicas procesar los enlaces Xxx-Pro, se espera que estos cambios favoreciesen la formación de complejos más estables entre la trombina y sus sustratos. Aunque para los casos de los conectores FVIIIa1 y FVIIIa3 aún no se han obtenido los resultados esperados, tal y como se discutió anteriormente, esta estrategia resultó exitosa en el caso del complejo de trombina·PAR1<sub>L</sub>(R42Q), por lo que se sigue trabajando en la búsqueda de condiciones de cristalización de complejos entre la trombina y estos conectores del factor VIII.

#### **5.2.2.2 Estudio de las bases moleculares de la interacción del conector FVIIIa1 humano con la trombina y el FX mediante RMN**

Nuestro siguiente objetivo fue caracterizar las interacciones entre el conector FVIIIa1 y la proteasa activadora, la trombina, así como con el sustrato del complejo FVIIIa1·FIXa, el FX. Mediante los ensayos de correlación de dos dimensiones  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del FVIIIa1 en presencia y ausencia de la proteinasa respectiva, se observó que el conector a1 interacciona de forma evidente con la trombina libre (Figura 4.28). Estas interacciones se ponen de manifiesto a través de dos cambios característicos en los espectros de resonancias: (1) cambios notables en los desplazamientos químicos (*chemical shifts*) de algunas de las resonancias al agregar la proteasa (Figura 4.35), y (2) cambios en la amplitud e intensidad de algunas señales por un efecto de ensanchamiento de las mismas, efecto comúnmente descrito en ensayos de RMN cuando una molécula pequeña interacciona con una macromolécula [Lane and Lefevre, 1994, Wider, 2000, Craik and Wilce, 1997, Lian, Barsukov, *et al.*, 1994]. Al analizar detalladamente estos dos efectos se evidencia que la intensidad de algunas de las señales de resonancia del FVIIIa1 libre disminuye, mientras que las señales del conector acomplejado solamente incrementan su intensidad al aumentar la concentración de trombina, sin percibirse ningún desplazamiento químico lineal unidireccional de las mismas. Estas observaciones indican que el intercambio entre el FVIIIa1 libre y unido a la trombina es lento, lo cual suele ocurrir cuando las

dos conformaciones de la molécula son energéticamente comparables, y sugiere interacciones estables con elevadas constantes de formación [Reid, MacLachlan, *et al.*, 1997, Lane and Lefevre, 1994, Craik and Wilce, 1997].

#### 5.2.2.2.1 Identificación de la región Glu<sup>331</sup>-Asp<sup>349</sup> del conector FVIIIa1 como sitio de interacción con la trombina

El conector del FVIIIa1 es un fragmento relativamente grande ( $M_r \approx 6.4$  kDa) que se predice intrínsecamente desordenado en ausencia de ligandos, y con una composición aminoacídica notablemente repetitiva (por ejemplo 9 residuos de aspartato y 6 de glutamato). A pesar de estas características, los ensayos de RMN realizados evidenciaron una apropiada dispersión de las resonancias, tanto en los ensayos de correlación  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  como en los del tipo  $^{13}\text{CO}$ - $^{15}\text{N}$ . Esto a su vez permitió asignar los residuos del FVIIIa1 sin ninguna ambigüedad a resonancias específicas, tanto libre (96% de los residuos) como en presencia de la proteasa activadora (93%). La comparación de estos espectros permitió definir inequívocamente los residuos del conector a1 del FVIII que interaccionan con la trombina.

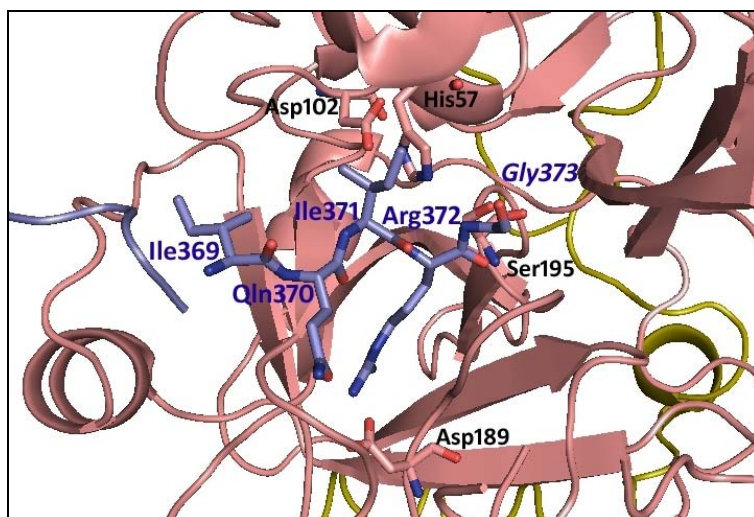
En la figura 5.6 se resumen de forma esquemática los desplazamientos observados en los dos tipos de experimentos de RMN realizados, HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  y CON  $^{13}\text{CO}$ - $^{15}\text{N}$ . En ambos casos se presenta la secuencia completa del fragmento recombinante FVIIIa1 y se resaltan en color rojo los residuos con desplazamientos más notables entre la señal de resonancia del FVIIIa1 libre y en presencia de trombina. En color naranja se destacan aquellos residuos cuyas resonancias experimentan desplazamientos más moderados, mientras que los residuos cuyas resonancias no se detectaron en los experimentos del FVIIIa1 en presencia de trombina, por el ensanchamiento de la señal, aparecen en celeste.

Como era de esperar, una de las regiones del FVIIIa1 que experimentaron mayores cambios en presencia de trombina libre corresponde a los residuos entre la Ile<sup>369</sup> (P<sub>4</sub>) y Gly<sup>373</sup> (P<sub>1'</sub>) del fragmento del sustrato, donde las resonancias de los residuos Ile<sup>369</sup> y Gln<sup>370</sup> presentan desplazamientos muy evidentes, y las de los residuos Ile<sup>371</sup> a Gly<sup>373</sup> incluso desaparecen. Esta observación confirma la validez de la estrategia empleada para estudiar las interacciones trombina-FVIII, ya que es la región C-terminal del fragmento donde se encuentra el sitio de corte para la trombina (Arg<sup>372</sup>-Gly<sup>373</sup>) (Figura 5.7). Por otra parte, estos resultados de los experimentos  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  confirmaron de forma independiente la existencia de una

segunda región de interacción con la proteasa activadora en el extremo N-terminal del conector, Glu<sup>331</sup>-Asn<sup>339</sup>, que eventualmente podría extenderse hasta el residuo Asp<sup>349</sup>. Teniendo en cuenta la orientación que adoptan los sustratos al unirse productivamente a proteasas serínicas, y en particular nuestros resultados previos sobre la interacción de la trombina con el conector  $\alpha 2$  del factor V [Corral-Rodriguez, Bock, *et al.*, 2011], así como el papel bien establecido del exosito I de la proteasa en la activación del FVIII [Myles, Yun, *et al.*, 2002], es lógico postular que estos residuos del FVIII interactúan con esta región básica de la trombina.

| A. Desplazamientos detectados mediante ensayos de correlación $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ :     |             |               |                                 |                     |               |  |  |  |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|---------------|---------------------------------|---------------------|---------------|--|--|--|--|
| 322                                                                                                | 330         | 340           | 350                             | 360                 | 370           |  |  |  |  |
| A S H H H H H H P                                                                                  | E E P Q L R | M K N N E E A | E D Y D D D L T D S E M D V V R | F D D D N S P S F I | Q I R G S G C |  |  |  |  |
| B. Desplazamientos detectados mediante ensayos de correlación $^{13}\text{CO}$ - $^{15}\text{N}$ : |             |               |                                 |                     |               |  |  |  |  |
| 322                                                                                                | 330         | 340           | 350                             | 360                 | 370           |  |  |  |  |
| A S H H H H H H P                                                                                  | E E P Q L R | M K N N E E A | E D Y D D D L T D S E M D V V R | F D D D N S P S F I | Q I R G S G C |  |  |  |  |

**Figura 5.6 Resumen esquemático de los residuos de FVIIIa1 que interactúan con la trombina.** En A se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de correlación  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  y en B los resultados de los ensayos de correlación  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ . La numeración corresponde a la del FVIII humano maduro. Los residuos resaltados en rojo indican un cambio notable en el desplazamiento de las resonancias del FVIIIa1 al comparar con el FVIIIa1 en presencia de trombina, resaltado en naranja un cambio más leve en el desplazamiento y en celeste se resaltan los residuos que no se detectan en los ensayos de RMN al agregar la trombina. Los residuos en *itálica* (del 322-329 y del 373-376) no corresponden al FVIIIa1 humano, sino al constructo realizado para la expresión del fragmento recombinante.

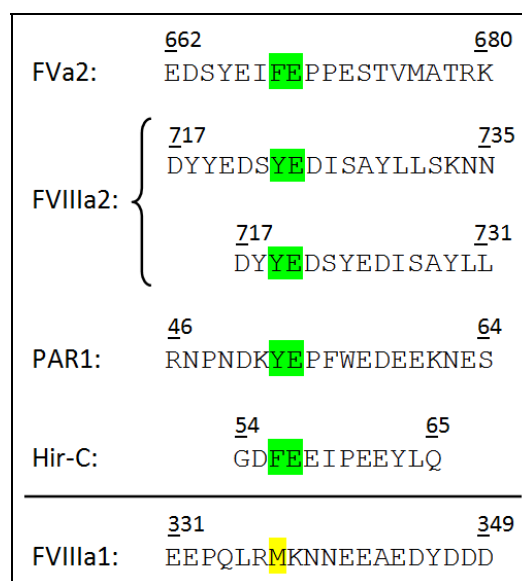


**Figura 5.7 Modelaje de la secuencia Ile<sup>369</sup>-Gly<sup>373</sup> correspondiente a los subsitos P<sub>4</sub>-P<sub>1</sub>' en su complejo productivo con la trombina.** A partir del análisis de los espectros de resonancia del FVIIIa1 libre y en presencia de la proteasa se evidenció un notable desplazamiento e incluso la desaparición de las señales de los residuos correspondientes a las posiciones P<sub>4</sub>-P<sub>1</sub>' del FVIIIa1 los cuales incluyen el sitio de corte y activación de la trombina. Con esta información se modeló la posible conformación de los residuos Ile<sup>369</sup>-Gly<sup>373</sup> (representados en *sticks* con código de colores: átomos de C en azul grisáceo, N en azul y O en rojo) en los bolsillos S<sub>4</sub>-S<sub>1</sub>' del sitio activo de la proteasa (color rosa/amarillo, se representa en *sticks* rosa los residuos de la triada catalítica y la Asp<sup>189</sup> de la proteinasa). El modelado se realizó a partir de la estructura de trombina·PAR1 reportada por [Gandhi, Chen, *et al.*, 2010].

La evidencia directa a favor de esta hipótesis abarca tanto nuestros resultados (discutidos más adelante), como los estudios previos que han reportado que la interacción del FVIII con los exositios de la trombina son requeridos para su activación, y que además el fragmento C-terminal de la hirudina inhibe la activación del FVIII al bloquear el exositio I de la proteinasa (ver Introducción, Figura 1.14A y [Esmon and Lollar, 1996, Bukys, Orban, *et al.*, 2006, Fay, 2004, Naski, Fenton, *et al.*, 1990, Liu, Brustad, *et al.*, 2007, Barrow, Healey, *et al.*, 1994]). Sin embargo, es importante destacar que la secuencia N-terminal del FVIIIa1 no presenta una homología clara con el péptido de la hirudina, ni con las secuencias semejantes a la de este inhibidor presentes en el conector FVa2 o en el dominio extracelular del receptor PAR1 (Figura 5.8). Como mencionamos en el epígrafe 5.2.1, tanto la estructura 3D de la trombina unida al receptor PAR1 ([Gandhi, Chen, *et al.*, 2010] y nuestros propios resultados, ver epígrafe 4.2.4.1), en complejo con la hirudina [Corral-Rodriguez, Macedo-Ribeiro, *et al.*, 2010, Rydel, Ravichandran, *et al.*, 1990] o el FVa2 [Corral-Rodriguez, Bock, *et al.*, 2011] revelan que un elemento esencial de la interacción de estos diversos ligandos con la proteasa es la inserción de un residuo aromático (Tyr<sup>52</sup> en PAR1, Phe<sup>56H</sup> en la hirudina, y Phe<sup>668</sup> en el FVa2) en una cavidad formada por átomos tanto de la cadena principal como de las cadenas laterales de los residuos Phe<sup>34</sup>, Leu<sup>40</sup>, Arg<sup>67</sup>, Arg<sup>73</sup> y Thr<sup>74</sup>. Además, estos residuos aromáticos son seguidos de un residuo de ácido glutámico (Glu<sup>53</sup> en PAR1, Glu<sup>57</sup> en la hirudina y Glu<sup>669</sup> en el FVa2), el cual forma puentes salinos con el grupo guanidinio de la Arg<sup>75</sup>. De este modo, este par de residuos adopta conformaciones muy similares en los complejos con la trombina.

Por el contrario, no hay ningún residuo aromático dentro de los identificados como parte de la secuencia del FVIIIa1 que interacciona con la trombina en nuestros experimentos de RMN (Figura 5.8). Sin embargo, ya que el residuo Met<sup>337</sup> es uno de los que experimenta cambios más notables al formarse el complejo trombina·FVIIIa1, podría especularse que este residuo hidrofóbico es el equivalente topológico de los residuos aromáticos de la hirudina, el FV y PAR1 mencionados más arriba. Sin embargo, una inspección más detallada de las secuencias de estas proteínas que interaccionan con el exositio I revela la presencia de una lisina en el FVIIIa1 inmediatamente después del residuo aromático que encaja en el bolsillo hidrofóbico (Figura 5.8). La ausencia de una homología clara entre la secuencia del FVIIIa1 y los motivos semejantes a la hirudina, entre otros aspectos discutidos más abajo sugiere que el conector

FVIIIa1 adopta una conformación que difiere sustancialmente de la de los ligandos caracterizados hasta el momento por cristalografía de rayos X.

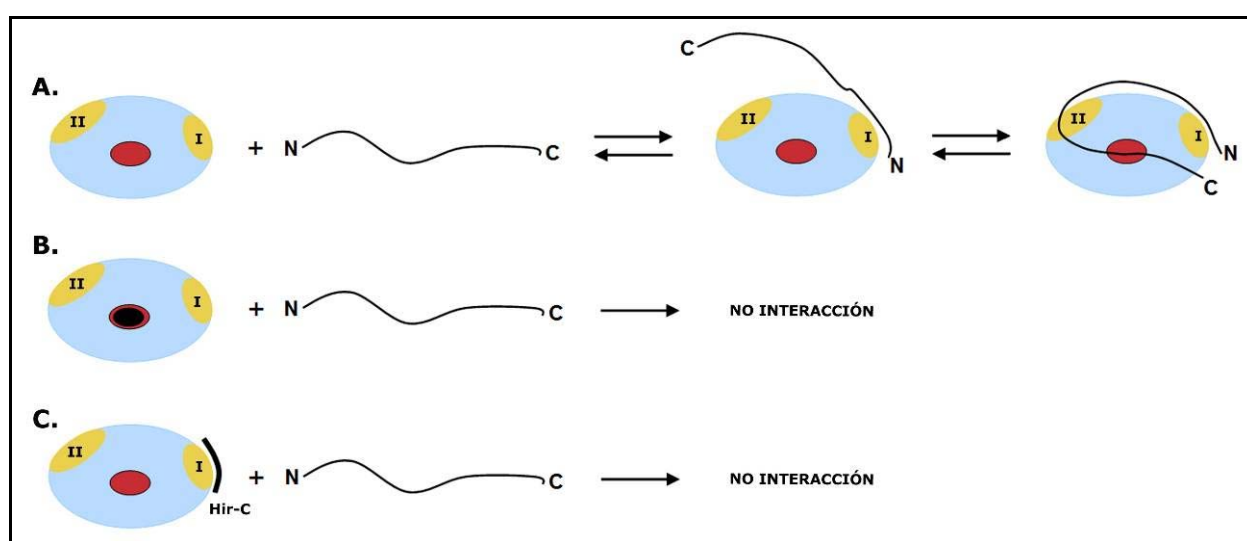


**Figura 5.8 Esquema parcial de las secuencias de los cofactores FVa2, FVIIIa1 y FVIIIa2, del dominio extracelular del receptor PAR1 y del péptido C-terminal de la hirudina.** Los residuos Glu<sup>666</sup>-Glu<sup>672</sup> del FVa2 [Corral-Rodriguez, Bock, *et al.*, 2011], Lys<sup>51</sup>-Phe<sup>55</sup> del PAR1 (en este trabajo y [Gandhi, Chen, *et al.*, 2010]), y Gly<sup>54</sup>-Gln<sup>65</sup> de la cola C-terminal de la hirudina (Hir-C) [Rydel, Ravichandran, *et al.*, 1990] interaccionan con el exosito I de la trombina. Los números corresponden a las proteínas maduras y se resaltan con fondo verde los residuos conservados. El conector FVIIIa2 presenta dos parejas de residuos Tyr-Glu topológicamente equivalentes a las demás secuencias. Como se puede observar las cinco secuencias son regiones ricas en aminoácidos de carácter ácido o aromático, en el caso del FVa2, PAR1 y de la Hir-C se ha reportado que el residuo aromático (resaltado en color verde) se encuentra completamente anclado en un bolsillo hidrofóbico en el exosito I, seguido de un residuo de ácido glutámico que forma puentes salinos con el residuo Arg<sup>75</sup> presente en el lazo 70-80 de la proteasa. Nótese que la Met<sup>337</sup> del FVIIIa1 (con fondo amarillo) podría ocupar la posición topológicamente equivalente en el exosito I de la trombina.

Otro aspecto importante a destacar de nuestros experimentos de RMN es la total ausencia de cambios en los espectros de resonancia del FVIIIa1 en presencia de moléculas de trombina con el sitio activo o el exosito I bloqueado. Estos resultados no son en absoluto evidentes habida cuenta de la gran distancia que separa ambas regiones de la molécula, y la gran flexibilidad esperable en un polipéptido que no posee puentes disulfuro, y muy probablemente carece de estructura secundaria estable en solución (Figura 5.9). Por estas razones, eran esperables interacciones trombina-FVIIIa1 limitadas al exosito I (en el caso de la trombina-FPR), o contactos con los residuos del sitio activo al emplear trombina inhibida con un exceso del péptido C-terminal de la hirudina.

De estos resultados se pueden extraer conclusiones importantes sobre el proceso de activación del FVIII. Primero, el acceso del sitio de corte y activación, Arg<sup>372</sup>-Ser<sup>373</sup> al sitio activo de la trombina es estrictamente dependiente de la interacción previa de la secuencia Glu<sup>331</sup>-

Asn<sup>339</sup> con el exosito I de la proteinasa, o una región muy cercana. Esta interacción con el exosito favorece el procesamiento del enlace Arg<sup>372</sup>-Ser<sup>373</sup> por varios motivos. Por una parte, y como hemos discutido anteriormente (epígrafe 5.1.2), existe una comunicación entre ambas regiones de la proteinasa, manifestada en la dirección sitio activo → exosito I por la resistencia a proteólisis del lazo 70-80 en la trombina inhibida con FPR (ver epígrafe 4.1.1 y Figura 4.2 en Resultados). Los experimentos de RMN sugieren que, de forma simétrica, la unión del péptido Glu<sup>331</sup>-Asn<sup>339</sup> del FVIIIa1 al exosito I induce una conformación en el sitio activo de la trombina que es más apropiada para la inserción de los residuos del sustrato alrededor del sitio de corte y activación, en una configuración estereoquímica favorable a su procesamiento.



**Figura 5.9 Representación esquemática de las interacciones de la trombina con el FVIIIa1.** La trombina se representa con un óvalo azul celeste, los exositos I y II en color amarillo y el centro activo en color rojo. En **A** se propone el modelo de interacción inicial entre el extremo N-terminal del FVIIIa1 y el exosito I de la trombina, y la posterior introducción del sitio de corte y activación del conector en el centro activo de la proteasa. En **B** se representa la trombina inhibida irreversiblemente con FPR, mientras que en **C** se representa la proteasa con el exosito I ocupado por el péptido C-terminal de la hirudina. Nótese que según los resultados de nuestros experimentos de RMN, el FVIIIa1 no interacciona con la proteasa en presencia de FPR o Hir-C.

Por otra parte, la formación de un complejo intermedio trombina·FVIIIa1 en el que sólo la región ácida N-terminal del conector contacta con la proteasa facilita extraordinariamente la “búsqueda” de la trayectoria apropiada a lo largo de la superficie de la molécula de trombina, de forma tal que los residuos P<sub>4</sub>-P<sub>1</sub>’ pueden insertarse entre los lazos que emparedan el sitio activo de la proteasa. De este modo, la combinación de un sitio activo más rígido y el pre-posicionamiento del enlace Arg<sup>372</sup>-Ser<sup>373</sup> a una distancia apropiada de la triada catalítica, explican la importancia de las interacciones mediadas por el exosito I en el proceso de activación del FVIII, y en particular de los residuos Arg<sup>73</sup>, Arg<sup>75</sup> y Tyr<sup>76</sup> de la proteinasa [Myles, Yun, *et al.*, 2002]. Por el contrario, el exosito II parece jugar un papel secundario en este



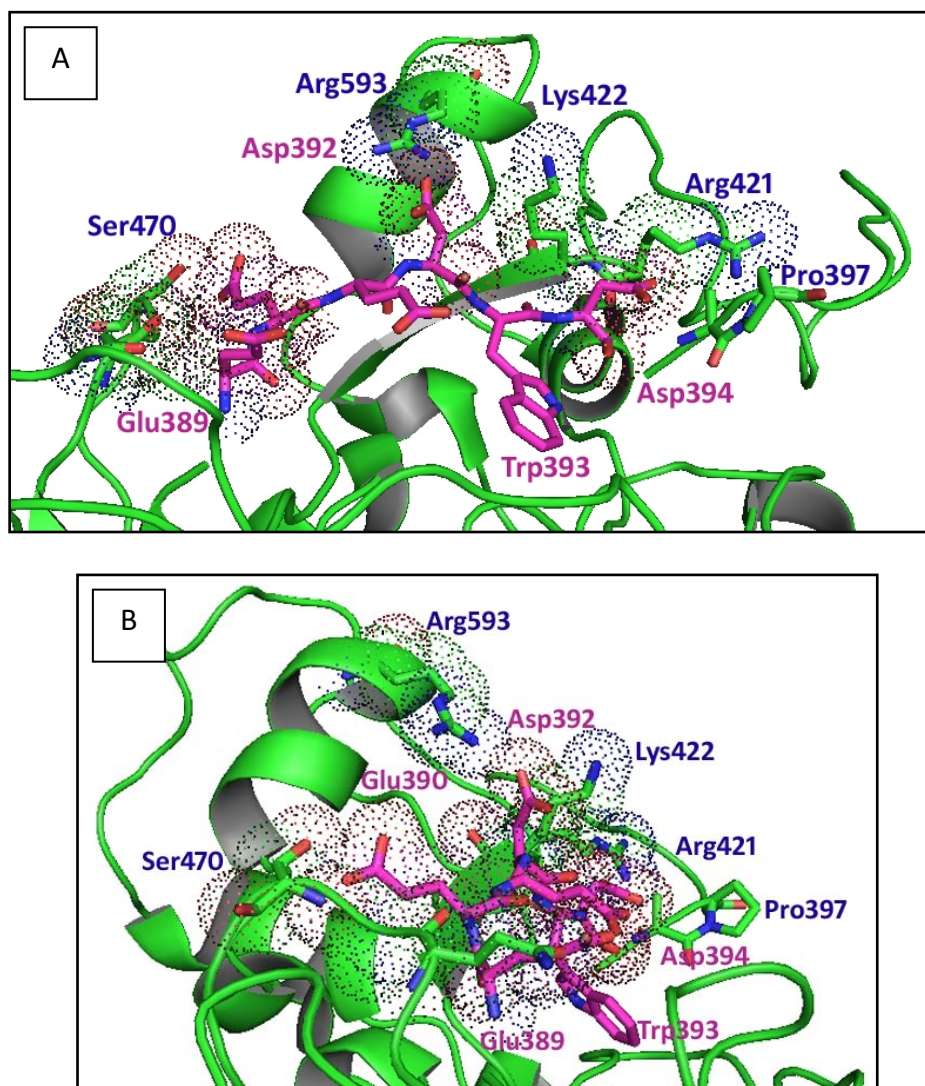
sentido, al menos para el corte entre los dominios A1 y A2, donde los cambios en los espectros de los residuos Asp<sup>362</sup> y Asp<sup>363</sup> en los experimentos <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N sugieren interacciones limitadas con algunos de los residuos básicos que forman este exosito.

Por otra parte, es quizás todavía más sorprendente que la ocupación del sitio activo de la trombina -y, con ello, la estabilización del lazo 70-80- en lugar de favorecer las interacciones con el FVIIIa1, las impida. Esta situación es completamente opuesta a la observada por nuestro grupo para el conector a2 del FV, el cual no se une a la trombina libre, pero sí a la inhibida con FPR [Corral-Rodriguez, Bock, *et al.*, 2011]. De este modo, y junto a la ausencia de homología entre la región Glu<sup>331</sup>-Asp<sup>349</sup> del FVIIIa1 con los motivos semejantes a la hirudina discutidos más arriba, apuntan a la existencia de un modo de unión radicalmente diferente al caracterizado hasta el momento por cristalografía de rayos X de complejos de la trombina con la hirudina, el PAR1 o el FVa2.

#### 5.2.2.2 Mecanismo de activación del FVIII humano mediado por la trombina

Diferentes regiones del FVIII se han asociado a posibles mecanismos de activación mediados por la trombina, incluyendo la región ácida que comprende los residuos Glu<sup>389</sup>-Asp<sup>394</sup> en la región N-terminal del dominio A2. Fay y colaboradores propusieron que este motivo semejante a la hirudina (E<sup>389</sup>EEDWD<sup>394</sup>) interacciona con el exosito II para facilitar el corte de activación entre los residuos Arg<sup>740</sup>-Ser<sup>741</sup> [Nogami, Zhou, *et al.*, 2005]. Sin embargo, la inspección de las estructuras 3D reportadas del FVIIIa1 reveló que la exposición de esta región, particularmente el residuo Trp<sup>393</sup> que está orientado hacia el cuerpo de la molécula -y conservado no solo en el FV y el FVIII, sino también en la ceruloplasmina-, requeriría un reordenamiento grande y muy poco probable de la subunidad A2 (Figura 5.10). Además, los residuos Asp<sup>392</sup> y Asp<sup>394</sup> que fueron mutados por alaninas también están envueltos en contactos intramoleculares importantes: se destaca que el grupo carboxilato del residuo Asp<sup>392</sup> está formando un puente salino fuerte con el grupo guanidinio de la Arg<sup>593</sup> (distancia: 2.7Å) (Figura 5.10 A), mientras que el Asp<sup>394</sup>, orientado hacia el cuerpo del cofactor, forma puentes de hidrógeno con el átomo de nitrógeno de la cadena principal de la Ala<sup>396</sup> y el carbonilo de la Arg<sup>421</sup> (Figura 5.10 A). Por lo tanto, es concebible que el mutante de alaninas en los residuos Asp<sup>392</sup> y Asp<sup>394</sup> que presenta una actividad específica equivalente a un fenotipo severo de hemofilia, reportado por Fay y colaboradores, se explica por una inestabilidad estructural global

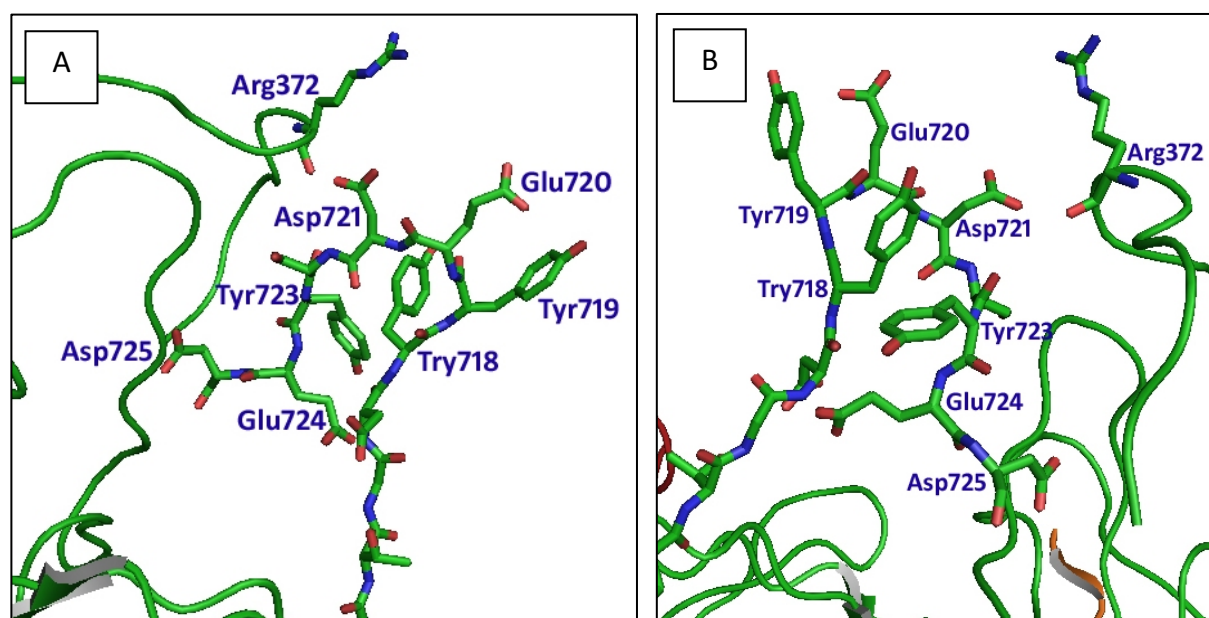
del FVIII mutante, y no por la pérdida de interacciones directas de estos residuos con el exosito II de la proteasa.



**Figura 5.10 Vista detallada de la estructura 3D alrededor de los residuos Glu<sup>389</sup>-Asp<sup>394</sup> del dominio A2 del FVIII.** La región Glu<sup>389</sup>-Asp<sup>394</sup> se representa de color morado (*sticks*), mientras que el resto de los residuos del dominio A2 en color verde, donde se destacan algunos residuos (en *sticks*) que interfieren con las posibles interacciones de esta región con el exosito II de la trombina. Algunos residuos de interés se representan con la superficie de Van der Waals correspondiente. En **A** y **B** se presentan dos diferentes vistas detalladas de la misma región del FVIII. Nótese que los residuos mutados por alanina (Asp<sup>392</sup> y Asp<sup>394</sup>) [Nogami, Zhou, *et al.*, 2005] están rodeados principalmente de los residuos de Arg<sup>593</sup>, Lys<sup>422</sup>, Arg<sup>421</sup> y Pro<sup>397</sup> por lo que es difícil pensar en una posible interacción de estos residuos con el exosito II de la proteasa. Las estructuras 3D se generaron con PyMol a partir de los códigos 2R7E y 3CDZ depositados en el PDB por [Ngo, Huang, *et al.*, 2008, Shen, Spiegel, *et al.*, 2008]. [Código de colores: átomos de C, morado o verde, N azul y O rojo].

También se ha asociado los residuos 717-725 (DYEDSYED) dentro del conector a2 del FVIII como posible mecanismo de activación, donde se reportó que mutaciones dirigidas a los residuos Asp y Glu de esta región reducen la velocidad de proteólisis por la trombina en los enlaces Arg<sup>372</sup>-Ser<sup>373</sup> y Arg<sup>1689</sup>-Ser<sup>1690</sup> del cofactor [Newell and Fay, 2008] (ver epígrafe 1.5.3 de la Introducción). En este sentido, la estructura reportada del FVIII (PDB: 2R7E) que presenta

parte del conector interdominios A2-B permitió analizar detalladamente la región de los residuos 717-725 presuntamente implicados en la interacción con la trombina. Por ejemplo, el reemplazamiento simultáneo de los pares de residuos ácidos Glu<sup>720</sup>/Asp<sup>721</sup> y Glu<sup>724</sup>/Asp<sup>725</sup> por alanina disminuyen en ~10 y ~30 veces la velocidad de proteólisis por la trombina sobre los sitios de corte Arg<sup>372</sup> y Arg<sup>1689</sup>, lo cual también se ha interpretado como prueba de que estos residuos participan en el mecanismo de activación del cofactor [Newell and Fay, 2008]. Sin embargo, a pesar de que el residuo Glu<sup>720</sup> se encuentra completamente expuesto al solvente, y es precedido por una tirosina también expuesta, la implicación funcional de los residuos Glu<sup>720</sup>/Asp<sup>721</sup> en interacciones directas con la trombina no es evidente, y probablemente requeriría de reordenamientos estructurales tanto en este conector como en el vecino FVIIIa1 (Figura 5.11). Consideraciones similares son aplicables al doblete Glu<sup>724</sup>/Asp<sup>725</sup> que se encuentra todavía menos accesible a la proteasa activadora en la estructura del FVIII.



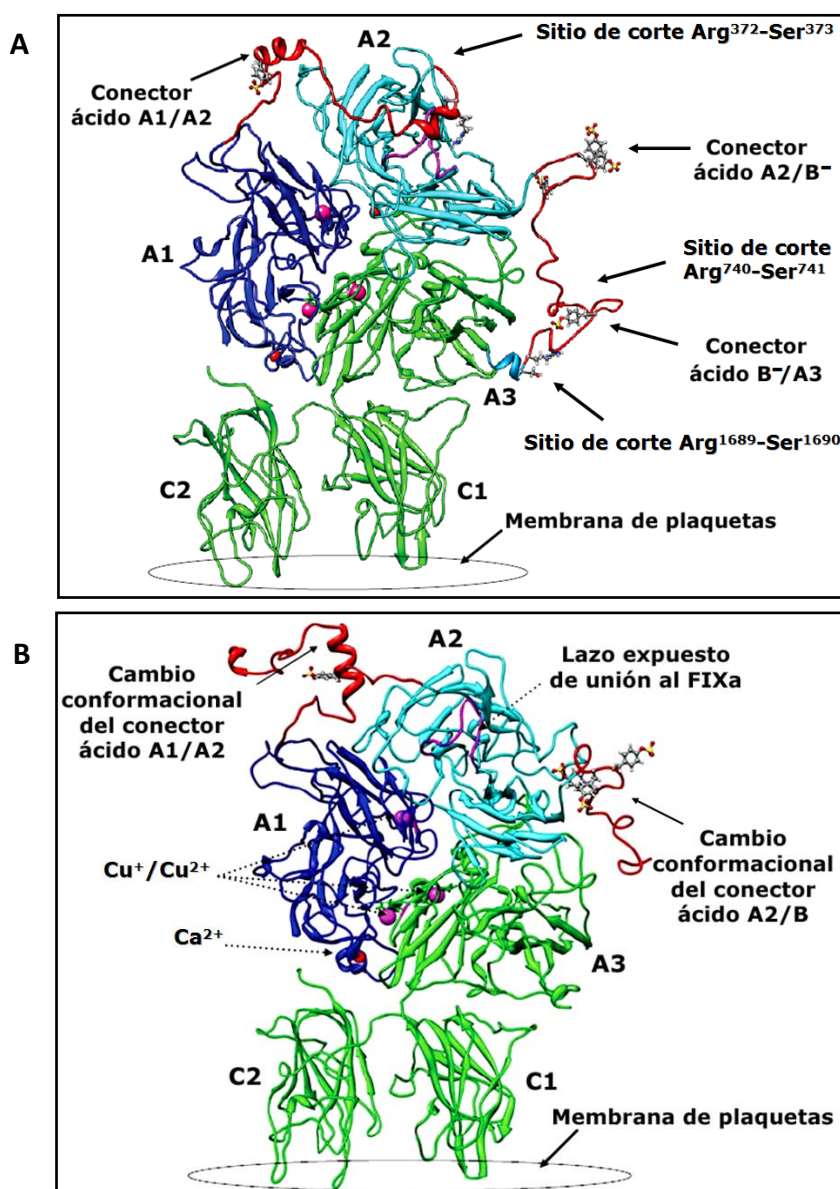
**Figura 5.11 Representación de la estructura 3D alrededor de los residuos Glu<sup>717</sup>-Asp<sup>725</sup> del conector a2 del FVIII.** La región que comprende los residuos Glu<sup>717</sup>-Asp<sup>725</sup> se representa en *sticks* en código de colores: verde (C), azul (N) y rojo (O). En **A** y **B** se presentan dos vistas detalladas de esta región con una rotación aproximada de 180° alrededor del eje Y. Nótese que los residuos Asp<sup>721</sup>, Glu<sup>724</sup> y Asp<sup>725</sup> están orientados hacia el interior de la molécula del cofactor, lo que impide cualquier posible interacción con los exositos de la trombina. Las estructuras 3D se generaron con PyMol a partir del código 2R7E depositado en el PDB por [Shen, Spiegel, *et al.*, 2008].

Finalmente, y evidenciando la importancia del papel funcional de los conectores interdominios del FVIII, se han reportado diferentes mutaciones que afectan a residuos que forman parte de los mismos. En este sentido, dentro de las alteraciones más importantes destaca la mutación *missense* p.Tyr346Cys, la cual es una de las diez mutaciones más frecuentemente reportadas a nivel mundial, según la base de datos de hemofilia A (HAMSTeRS;

www.hadb.org.uk). El cambio de este residuo de tirosina por cisteína en el conector FVIIIa1 causa un fenotipo entre intermedio y severo de hemofilia A, y refuerza nuestras observaciones de que los residuos Glu<sup>331</sup>-Asp<sup>349</sup> participan en la interacción del FVIIIa1 con la trombina. En esta misma base de datos, otra de las alteraciones más frecuentemente reportada es la mutación *missense* p.Arg1689Cys, que también causa un fenotipo entre intermedio y severo de esta patología, como consecuencia de la eliminación del sitio de corte y activación del FVIII, Arg<sup>1689</sup>-Ser<sup>1690</sup>.

### 5.2.2.2.3 Modelo de activación del FVIII

A pesar de que el FVIII es topológicamente equivalente al FV, este último carece del sitio de corte entre los dominios A1 y A2. Sin embargo, es razonable esperar que los elementos esenciales del modelo postulado para la activación del FV [Corral-Rodriguez, Bock, *et al.*, 2011] sean también válidos para el cofactor homólogo, y en particular el “desplazamiento” de la trombina de un sitio de corte al otro por interacciones mediadas por los exositios. En el caso del FVIII, el sitio de corte y activación inicial se encuentra en la frontera entre los dominios A2 y B (Arg<sup>740</sup>-Ser<sup>741</sup>), que escinde el dominio B y como consecuencia se incrementa la velocidad de hidrólisis de los enlaces Arg<sup>372</sup>-Ser<sup>373</sup> y Arg<sup>1689</sup>-Ser<sup>1690</sup> por la trombina [Newell and Fay, 2007, Hill-Eubanks, Parker, *et al.*, 1989]. Como hemos mencionado antes, varios estudios proponen que las interacciones del conector a2 (711-740) con la proteasa se dan a través del exosito II [Esmon and Lollar, 1996, Nogami, Zhou, *et al.*, 2005, Barrow, Healey, *et al.*, 1994]. En este sentido, debido a que este péptido es más corto (29 residuos) que el resto de los conectores tanto del FVIII como del FV, es más probable que algunos residuos ácidos y/o alguna de las cuatro tirosinas del conector FVIIIa2 interactúen con el exosito II, y permitan la correcta presentación del sitio de corte Arg<sup>740</sup>-Ser<sup>741</sup> en el centro activo de la proteasa. Una vez realizado este corte inicial, y considerando la cercanía espacial de las regiones a1 y a2 observada en las estructuras cristalinas reportadas (Figura 5.12) [Ngo, Huang, *et al.*, 2008, Shen, Spiegel, *et al.*, 2008, Venkateswarlu, 2010], podemos suponer que el modelo del “desplazamiento” de la trombina de un sitio de corte al otro por interacciones mediadas por los exositios es válido, y permitiría explicar el segundo corte de activación en el enlace Arg<sup>372</sup>-Ser<sup>373</sup> (dominios A1-A2) favorecido por la interacción inicial de los residuos Glu<sup>331</sup>-Asp<sup>349</sup> con el exosito I de la trombina, según nuestros resultados experimentales.

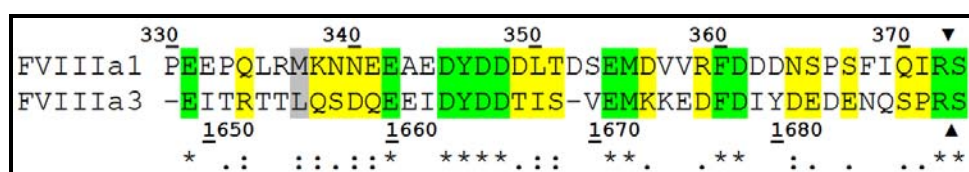


**Figura 5.12 Modelo de los cambios conformacionales propuestos durante la activación del FVIII generados por dinámica molecular.** La estructura 3D de la variante del FVIII sin el dominio B reportada previamente por [Shen, Spiegel, *et al.*, 2008] (PDB: 2R7E) fue modelada y refinada mediante simulaciones de dinámica molecular de 75-80 ns por [Venkateswarlu, 2010]. Los modelos incluyen los conectores interdominios ácidos del cofactor (destacados en color rojo); se resaltan en *sticks* los sitios de posible sulfatación de tirosinas en estos conectores, y los iones de cobre y calcio se representan mediante esferas de color morado y rojo, respectivamente. **A.** La representación del cofactor inactivo evidencia la proximidad de los conectores a1 y a2 del FVIII, lo que apoya el modelo del “desplazamiento” de la trombina de un sitio de corte a otro por interacciones mediadas por los exositos. **B.** En el modelo del cofactor activo se observan los cambios conformacionales de las regiones interconectoras a1 y a2, así como la pérdida del conector a3 luego de los cortes de activación respectivos (Arg<sup>372</sup>, Arg<sup>740</sup> y Arg<sup>1689</sup>). Se indica también el lazo putativo de unión al FIXa (residuos Try<sup>555</sup>-Asp<sup>569</sup>, color morado), expuesto como consecuencia de la activación del cofactor. Figura modificada de [Venkateswarlu, 2010].

Pese a la limitada homología de secuencia entre los tres conectores del FVIII, y de los mismos con las regiones topológicamente equivalentes del FV, es posible extrapolar los resultados obtenidos previamente para los conectores FVa2 y FVIIIa1 a las interacciones de los conectores FVIIIa2 y FVIIIa3 con la proteasa activadora. Al comparar los conectores ácidos a1 y



a3 del FVIII se observa que además de longitudes muy similares (44 vs. 42 residuos) presentan una homología razonablemente alta (11 residuos estrictamente conservados, además de 6 sustituciones conservativas). En particular, el tetrapéptido <sup>345</sup>DYDD<sup>348</sup> estrictamente conservado tiene su contraparte exacta en la secuencia Asp<sup>1663</sup>-Asp<sup>1666</sup> (Figura 5.13). El análisis de estas regiones topológicamente equivalentes permite extrapolar los resultados obtenidos en este trabajo de investigación con el fragmento FVIIIa1 al conector interdominios a3-A3, y plantear la hipótesis de que el FVIIIa3 interacciona principalmente con el exosito I de la trombina a través de la región más N-terminal, Glu<sup>1649</sup>-Asp<sup>1666</sup>, para la correcta presentación del sitio de corte y activación Arg<sup>1689</sup>-Ser<sup>1690</sup> en el centro activo de la proteasa activadora y generar finalmente el FVIII completamente activo.



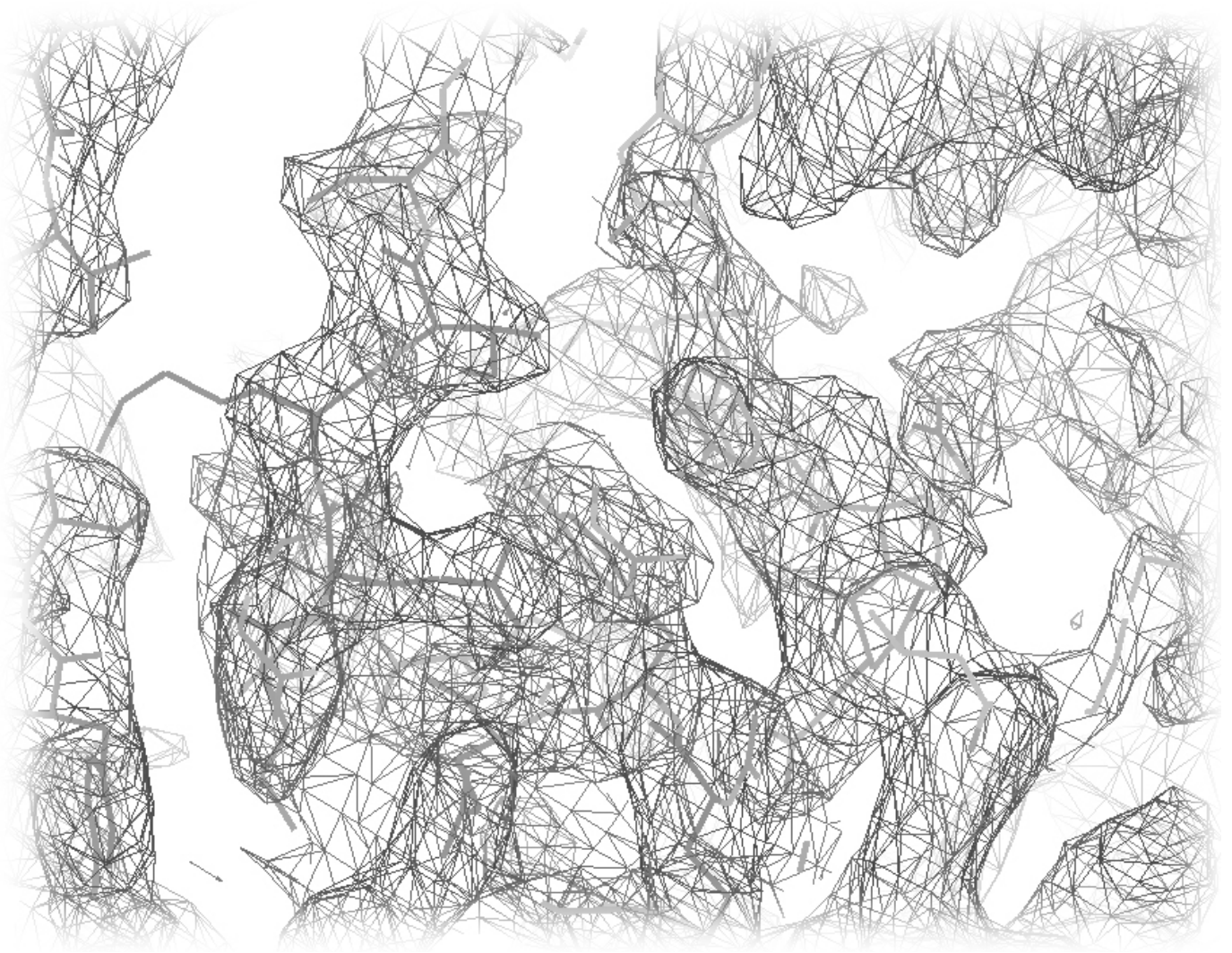
**Figura 5.13 Alineamiento de las secuencias de los conectores interdominios a1 y a3 del FVIII humano.** Se presentan las secuencias de las regiones FVIIIa1 y FVIIIa3 con la numeración correspondiente al FVIII humano maduro. Los residuos estrictamente conservados se muestran con fondo verde; otros residuos reemplazados conservativamente están sombreados en amarillo. El sitio de corte por la trombina se indica con un triángulo. Nótese la homología entre los dos conectores, particularmente de los residuos DYDD que permiten extrapolar los resultados obtenidos con el FVIIIa1 al FVIIIa3. El alineamiento fue generado con *T-Coffee* [Notredame, Higgins, et al., 2000, Poirot, O'Toole, et al., 2003].

A partir de los resultados de los ensayos de RMN obtenidos en esta investigación se diseñaron mutantes del conector FVIIIa1 para evaluar mediante resonancia de plasmones de superficie la contribución relativa de los residuos que presuntamente se unen al exosito I, a su afinidad por la trombina. Además, se sintetizó el péptido Glu<sup>331</sup>-Asp<sup>349</sup> y se iniciaron ensayos de cristalización con trombina.

#### 5.2.2.2.4 Estudio de la interacción del conector FVIIa1 con el factor X mediante RMN

Finalmente, nuestros experimentos de RMN conducidos en presencia del FX humano natural no arrojaron ninguna evidencia de interacciones entre el conector ácido FVIIIa1, y el sustrato del complejo X-asa (ver Figura 4.30B en Resultados). Nuestras observaciones contradicen un reporte previo de Fay y colaboradores, según los cuales la región que comprende los residuos 337-372, y particularmente los residuos Asp<sup>361</sup>-Asp<sup>363</sup> del FVIIIa1 presentan afinidad por el exosito de unión a heparina presente tanto en el zimógeno (FX) como en el FXa [Nogami, Freas, et al., 2004].

Aunque es difícil comparar resultados obtenidos empleando técnicas y materiales diferentes, sí que es posible realizar una serie de consideraciones acerca de la posible implicación -o no- del conector FVIIIa1 en el reconocimiento del sustrato, FX, por el complejo X-asa. En primer lugar, destacamos que, en nuestras manos, los ensayos de RMN en solución utilizando el fragmento recombinante FVIIIa1 permitieron estudiar de forma detallada las interacciones con la trombina, identificando con experimentos complementarios e independientes los residuos que establecen contactos más fuertes con la proteasa. Esto, a pesar de la relativamente baja afinidad de esta interacción. (Nótese que la interacción es inhibida por el péptido C-terminal de la hirudina que se une a la proteasa con una constante de inhibición aproximada de 0.54  $\mu\text{M}$  [Naski, Fenton, *et al.*, 1990]). Por tanto, la interacción putativa entre el FX y el conector parece ser de mucha menos afinidad, a juzgar por los espectros esencialmente idénticos del FVIIIa1 marcado, en presencia y ausencia del sustrato. Una interacción tan débil es poco probable que contribuya decisivamente al reconocimiento y procesamiento del FX por el FIXa unido al FVIIIa, aunque no puede descartarse que este conector forme parte de una plataforma más extensa de reconocimiento del sustrato.



## 6. CONCLUSIONES





**A. Plasticidad y termoestabilidad de la trombina**

1. La ocupación del sitio activo o del exosito I de la trombina por ligandos específicos conduce a incrementos significativos en la estabilidad térmica. Además, nuestros experimentos de microcalorimetría y de termofluorescencia demuestran que existe un efecto sinérgico sobre la termoestabilidad de la trombina por la presencia simultánea de ligandos específicos del sitio activo (FPR) y del exosito I (péptido C-terminal de la hirudina).
2. Mediante ensayos de proteólisis limitada con Arg-C se demostró un incremento en estabilidad estructural de la trombina en presencia de ligandos específicos del sitio activo, que afectan principalmente el lazo 70-80 del exosito I.
3. Las estructuras 3D refinadas a alta resolución, de trombina libre e inhibida irreversiblemente con FPR permitieron evidenciar el reordenamiento e incremento en la estabilidad estructural del lazo 70-80 del exosito I de la proteasa.
4. Se obtuvieron cuatro estructuras tridimensionales de trombina libre o inhibida con FPR con empaquetamientos -y por tanto, con dimensiones de celda- no reportadas previamente en la literatura. Estas estructuras 3D confirmaron, nuestras observaciones sobre el reordenamiento y la estabilidad estructural de esta proteasa serínica, y en particular de su lazo 70-80.

**B. Bases moleculares de la interacción del receptor PAR1 con la trombina**

5. Se establecieron protocolos para la sobreexpresión heteróloga en *E. coli* y la purificación de dos formas recombinantes del dominio extracelular del receptor de plaquetas PAR1 que permiten obtener cantidades suficientes de estas proteínas con la pureza y homogeneidad necesarias para estudios estructurales.
6. Se demostró cualitativamente la formación de complejos entre el dominio extracelular de PAR1 y la trombina libre mediante ensayos de electroforesis en condiciones nativas.
7. La modulación del sitio de corte y activación en el dominio extracelular de PAR1 con la mutación R41Q, permitió cristalizar el complejo trombina·PAR1<sub>L</sub>(R41Q) y determinar la estructura tridimensional mediante reemplazamiento molecular. La estructura fue refinada a una resolución de 3.0 Å.
8. Se determinó que el dominio extracelular del receptor PAR1 humano interacciona con el exosito I de la trombina a través de su región semejante a la hirudina, Lys<sup>51</sup>-Glu<sup>57</sup>. La

multitud de interacciones con la proteasa activadora y su conservación sugieren que los residuos Tyr<sup>52</sup> y Phe<sup>55</sup> juegan un papel fundamental en el mecanismo de activación. Este importante papel es también sugerido por su equivalencia topológica con los residuos Phe<sup>668</sup> y Pro<sup>671</sup> del FV, y Phe<sup>56H</sup> e Ile<sup>56H</sup> del péptido C-terminal de la hirudina, respectivamente.

### C. Bases moleculares de la activación del FVIII mediada por la trombina

9. Se han sobreexpresado heterológicamente en *E. coli*, y purificado los fragmentos del FVIII humano correspondientes a los conectores FVIIIa1, FVIIIa2 y FVIIIa3.
10. Se demostró cualitativamente la formación de complejos de los conectores ácidos FVIIIa1 y FVIIIa3 con la trombina libre en disolución mediante electroforesis en condiciones nativas. Asimismo, se demostró mediante ensayos de RMN que el FVIIIa1 se une a la trombina libre, pero no a la trombina inhibida con FPR o con el péptido C-terminal de la hirudina.
11. Mediante experimentos de RMN utilizando muestras de FVIIIa1 marcadas con nitrógeno-15 y/o carbono-13, se lograron asignar los residuos del conector a las resonancias correspondientes tanto en su forma libre como unido a la trombina. A partir del análisis de los espectros de RMN se demostró que el FVIIIa1 interacciona con el exosito I de la proteasa a través de sus residuos más N-terminales, Glu<sup>331</sup>-Asp<sup>349</sup>.
12. Basados en los resultados de estos experimentos de RMN y en nuestros resultados previos con el conector FVa2 [Corral-Rodriguez, Bock, *et al.*, 2011], hemos propuesto un modelo de interacción del conector FVIIIa1 con la trombina, según el cual el conector interacciona inicialmente con el exosito I para a continuación rodear la molécula de trombina y presentar el enlace Arg<sup>372</sup>-Ser<sup>373</sup> en el centro activo de la proteasa en una conformación óptima para su hidrólisis. Dada la similitud de secuencias, el presente modelo de interacción se especula común a la interacción de la proteinasa serínica con el conector entre los dominios B-A3 del FVIII (FVIIIa3).



## 7. BIBLIOGRAFÍA



1. Rosendaal, FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* **1999**;353:1167-73.
2. Rosendaal, FR. Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2005**:1-12.
3. Virchow, R. Phlogose und Thrombose im Gefäßsystem. Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medizin Frankfurt: Staatsdruckerei, **1856**.
4. Seligsohn, U, Zivelin, A. Thrombophilia as a multigenic disorder. *Thromb Haemost* **1997**;78:297-301.
5. Dahlback, B, Carlsson, M, Svensson, PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**;90:1004-8.
6. Williamson, D, Brown, K, Luddington, R, Baglin, C, Baglin, T. Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306-->Thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood* **1998**;91:1140-4.
7. Chan, WP, Lee, CK, Kwong, YL, Lam, CK, Liang, R. A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood* **1998**;91:1135-9.
8. Zoller, B, Dahlback, B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet* **1994**;343:1536-8.
9. Garcia de Frutos, P, Fuentes-Prior, P, Hurtado, B, Sala, N. Molecular basis of protein S deficiency. *Thromb Haemost* **2007**;98:543-56.
10. Lane, DA, Caso, R. Antithrombin: structure, genomic organization, function and inherited deficiency. *Baillieres Clin Haematol* **1989**;2:961-98.
11. Dahlback, B. Blood coagulation. *Lancet* **2000**;355:1627-32.
12. Vencesla, A, Corral-Rodriguez, MA, Baena, M, Cornet, M, Domenech, M, Baiget, M, Fuentes-Prior, P, Tizzano, EF. Identification of 31 novel mutations in the F8 gene in Spanish hemophilia A patients: structural analysis of 20 missense mutations suggests new intermolecular binding sites. *Blood* **2008**;111:3468-78.
13. Sakariassen, KS, Bolhuis, PA, Sixma, JJ. Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-Von Willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature* **1979**;279:636-8.
14. Morrissey, JH. Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost* **2001**;86:66-74.
15. Baugh, RJ, Broze, GJ, Jr., Krishnaswamy, S. Regulation of extrinsic pathway factor Xa formation by tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem* **1998**;273:4378-86.
16. Dahlback, B, Villoutreix, BO. Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway. *J Thromb Haemost* **2003**;1:1525-34.
17. Dahlback, B. Progress in the understanding of the protein C anticoagulant pathway. *Int J Hematol* **2004**;79:109-16.
18. Dahlback, B, Villoutreix, BO. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2005**;25:1311-20.
19. Esmon, NL. Thrombomodulin. *Prog Hemost Thromb* **1989**;9:29-55.
20. Fuentes-Prior, P, Iwanaga, Y, Huber, R, Pagila, R, Rumennik, G, Seto, M, Morser, J, Light, DR, Bode, W. Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature* **2000**;404:518-25.
21. Schwarz, HP, Fischer, M, Hopmeier, P, Batard, MA, Griffin, JH. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* **1984**;64:1297-300.

22. Egeberg, O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* **1965**;13:516-30.
23. Griffin, JH, Evatt, B, Zimmerman, TS, Kleiss, AJ, Wideman, C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* **1981**;68:1370-3.
24. Davie, EW, Ratnoff, OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* **1964**;145:1310-2.
25. Macfarlane, RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* **1964**;202:498-9.
26. Nemerson, Y, Repke, D. Tissue factor accelerates the activation of coagulation factor VII: the role of a bifunctional coagulation cofactor. *Thromb Res* **1985**;40:351-8.
27. Rao, LV, Rapaport, SI. Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**;85:6687-91.
28. Sakai, T, Lund-Hansen, T, Paborsky, L, Pedersen, AH, Kisiel, W. Binding of human factors VII and VIIa to a human bladder carcinoma cell line (J82). Implications for the initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation. *J Biol Chem* **1989**;264:9980-8.
29. Hagen, FS, Gray, CL, O'Hara, P, Grant, FJ, Saari, GC, Woodbury, RG, Hart, CE, Insley, M, Kisiel, W, Kurachi, K, et al. Characterization of a cDNA coding for human factor VII. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**;83:2412-6.
30. Radcliffe, R, Nemerson, Y. Activation and control of factor VII by activated factor X and thrombin. Isolation and characterization of a single chain form of factor VII. *J Biol Chem* **1975**;250:388-95.
31. Masys, DR, Bajaj, SP, Rapaport, SI. Activation of human factor VII by activated factors IX and X. *Blood* **1982**;60:1143-50.
32. Wildgoose, P, Kisiel, W. Activation of human factor VII by factors IXa and Xa on human bladder carcinoma cells. *Blood* **1989**;73:1888-95.
33. Pedersen, AH, Nordfang, O, Norris, F, Wiberg, FC, Christensen, PM, Moeller, KB, Meidahl-Pedersen, J, Beck, TC, Norris, K, Hedner, U, et al. Recombinant human extrinsic pathway inhibitor. Production, isolation, and characterization of its inhibitory activity on tissue factor-initiated coagulation reactions. *J Biol Chem* **1990**;265:16786-93.
34. Romisch, J. Factor VII activating protease (FSAP): a novel protease in hemostasis. *Biol Chem* **2002**;383:1119-24.
35. Corral-Rodriguez, MA, Macedo-Ribeiro, S, Barbosa Pereira, PJ, Fuentes-Prior, P. Tick-derived Kunitz-type inhibitors as antihemostatic factors. *Insect Biochem Mol Biol* **2009**;39:579-95.
36. Bauer, KA, Kass, BL, ten Cate, H, Hawiger, JJ, Rosenberg, RD. Factor IX is activated in vivo by the tissue factor mechanism. *Blood* **1990**;76:731-6.
37. Di Scipio, RG, Kurachi, K, Davie, EW. Activation of human factor IX (Christmas factor). *J Clin Invest* **1978**;61:1528-38.
38. Osterud, B, Rapaport, SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**;74:5260-4.
39. Di Scipio, RG, Hermodson, MA, Davie, EW. Activation of human factor X (Stuart factor) by a protease from Russell's viper venom. *Biochemistry* **1977**;16:5253-60.
40. Mann, KG. Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost* **1999**;82:165-74.
41. Davie, EW, Fujikawa, K, Kisiel, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* **1991**;30:10363-70.

42. Lenting, PJ, van Mourik, JA, Mertens, K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood* **1998**;92:3983-96.
43. van Dieijen, G, Tans, G, Rosing, J, Hemker, HC. The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J Biol Chem* **1981**;256:3433-42.
44. Tracy, PB, Nesheim, ME, Mann, KG. Coordinate binding of factor Va and factor Xa to the unstimulated platelet. *J Biol Chem* **1981**;256:743-51.
45. Mann, KG, Nesheim, ME, Church, WR, Haley, P, Krishnaswamy, S. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood* **1990**;76:1-16.
46. Bode, W, Turk, D, Sturzebecher, J. Geometry of binding of the benzamidine- and arginine-based inhibitors N alpha-(2-naphthyl-sulphonyl-glycyl)-DL-p-amidinophenylalanyl-piperidine (NAPAP) and (2R,4R)-4-methyl-1-[N alpha-(3-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-8-quinolinesulphonyl)-L-arginy]-2-piperidine carboxylic acid (MQPA) to human alpha-thrombin. X-ray crystallographic determination of the NAPAP-trypsin complex and modeling of NAPAP-thrombin and MQPA-thrombin. *Eur J Biochem* **1990**;193:175-82.
47. Nesheim, ME, Taswell, JB, Mann, KG. The contribution of bovine Factor V and Factor Va to the activity of prothrombinase. *J Biol Chem* **1979**;254:10952-62.
48. Monkovic, DD, Tracy, PB. Functional characterization of human platelet-released factor V and its activation by factor Xa and thrombin. *J Biol Chem* **1990**;265:17132-40.
49. Nesheim, ME, Mann, KG. Thrombin-catalyzed activation of single chain bovine factor V. *J Biol Chem* **1979**;254:1326-34.
50. Esmon, CT. The subunit structure of thrombin-activated factor V. Isolation of activated factor V, separation of subunits, and reconstitution of biological activity. *J Biol Chem* **1979**;254:964-73.
51. Suzuki, K, Dahlback, B, Stenflo, J. Thrombin-catalyzed activation of human coagulation factor V. *J Biol Chem* **1982**;257:6556-64.
52. Blomback, B, Blomback, M. The molecular structure of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci* **1972**;202:77-97.
53. Lorand, L. Factor XIII: structure, activation, and interactions with fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci* **2001**;936:291-311.
54. Coughlin, SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* **2005**;3:1800-14.
55. Gandhi, PS, Chen, Z, Appelbaum, E, Zapata, F, Di Cera, E. Structural basis of thrombin-protease-activated receptor interactions. *IUBMB Life* **2011**;63:375-82.
56. Ludeman, MJ, Kataoka, H, Srinivasan, Y, Esmon, NL, Esmon, CT, Coughlin, SR. PAR1 cleavage and signaling in response to activated protein C and thrombin. *J Biol Chem* **2005**;280:13122-8.
57. Ayala, YM, Cantwell, AM, Rose, T, Bush, LA, Arosio, D, Di Cera, E. Molecular mapping of thrombin-receptor interactions. *Proteins* **2001**;45:107-16.
58. Mitchell, L, Piovella, F, Ofosu, F, Andrew, M. Alpha-2-macroglobulin may provide protection from thromboembolic events in antithrombin III-deficient children. *Blood* **1991**;78:2299-304.
59. Ye, S, Goldsmith, EJ. Serpins and other covalent protease inhibitors. *Curr Opin Struct Biol* **2001**;11:740-5.
60. Esmon, CT. Regulation of blood coagulation. *Biochim Biophys Acta* **2000**;1477:349-60.
61. Esmon, CT, Owen, WG. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1981**;78:2249-52.
62. Esmon, CT. The protein C pathway. *Chest* **2003**;124:26S-32S.



63. He, X, Shen, L, Villoutreix, BO, Dahlback, B. Amino acid residues in thrombin-sensitive region and first epidermal growth factor domain of vitamin K-dependent protein S determining specificity of the activated protein C cofactor function. *J Biol Chem* **1998**;273:27449-58.
64. Nyberg, P, Dahlback, B, Garcia de Frutos, P. The SHBG-like region of protein S is crucial for factor V-dependent APC-cofactor function. *FEBS Lett* **1998**;433:28-32.
65. Evenas, P, Garcia de Frutos, P, Nicolaes, GA, Dahlback, B. The second laminin G-type domain of protein S is indispensable for expression of full cofactor activity in activated protein C-catalysed inactivation of factor Va and factor VIIIa. *Thromb Haemost* **2000**;84:271-7.
66. Shen, L, Dahlback, B. Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J Biol Chem* **1994**;269:18735-8.
67. Lu, D, Kalafatis, M, Mann, KG, Long, GL. Comparison of activated protein C/protein S-mediated inactivation of human factor VIII and factor V. *Blood* **1996**;87:4708-17.
68. Bode, W, Turk, D, Karshikov, A. The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Sci* **1992**;1:426-71.
69. Bode, W, Mayr, I, Baumann, U, Huber, R, Stone, SR, Hofsteenge, J. The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *EMBO J* **1989**;8:3467-75.
70. Huntington, JA. Thrombin plasticity. *Biochim Biophys Acta* **2012**;1824:246-52.
71. Lechtenberg, BC, Johnson, DJ, Freund, SM, Huntington, JA. NMR resonance assignments of thrombin reveal the conformational and dynamic effects of ligation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**;107:14087-92.
72. Di Cera, E, Page, MJ, Bah, A, Bush-Pelc, LA, Garvey, LC. Thrombin allostery. *Phys Chem Chem Phys* **2007**;9:1291-306.
73. van de Loch, A, Stubbs, MT, Bode, W, Friedrich, T, Bollschweiler, C, Hoffken, W, Huber, R. The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? *EMBO J* **1996**;15:6011-7.
74. Fuentes-Prior, P, Noeske-Jungblut, C, Donner, P, Schleuning, WD, Huber, R, Bode, W. Structure of the thrombin complex with triabin, a lipocalin-like exosite-binding inhibitor derived from a triatomine bug. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**;94:11845-50.
75. Bode, W. The structure of thrombin: a Janus-headed proteinase. *Semin Thromb Hemost* **2006**;32 Suppl 1:16-31.
76. Huntington, JA. Molecular recognition mechanisms of thrombin. *J Thromb Haemost* **2005**;3:1861-72.
77. Pechik, I, Madrazo, J, Mosesson, MW, Hernandez, I, Gilliland, GL, Medved, L. Crystal structure of the complex between thrombin and the central "E" region of fibrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**;101:2718-23.
78. Corral-Rodriguez, MA, Bock, PE, Hernandez-Carvajal, E, Gutierrez-Gallego, R, Fuentes-Prior, P. Structural basis of thrombin-mediated factor V activation: the Glu666-Glu672 sequence is critical for processing at the heavy chain-B domain junction. *Blood* **2011**;117:7164-73.
79. Marque, PE, Spuntarelli, R, Juliano, L, Aiach, M, Le Bonniec, BF. The role of Glu(192) in the allosteric control of the S(2)' and S(3)' subsites of thrombin. *J Biol Chem* **2000**;275:809-16.

80. Schechter, I, Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **1967**;27:157-62.
81. Le Bonniec, BF, MacGillivray, RT, Esmon, CT. Thrombin Glu-39 restricts the P'3 specificity to nonacidic residues. *J Biol Chem* **1991**;266:13796-803.
82. Wu, QY, Sheehan, JP, Tsiang, M, Lentz, SR, Birktoft, JJ, Sadler, JE. Single amino acid substitutions dissociate fibrinogen-clotting and thrombomodulin-binding activities of human thrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**;88:6775-9.
83. Pineda, AO, Cantwell, AM, Bush, LA, Rose, T, Di Cera, E. The thrombin epitope recognizing thrombomodulin is a highly cooperative hot spot in exosite I. *J Biol Chem* **2002**;277:32015-9.
84. Gandhi, PS, Chen, Z, Di Cera, E. Crystal structure of thrombin bound to the uncleaved extracellular fragment of PAR1. *J Biol Chem* **2010**;285:15393-8.
85. Segers, K, Dahlback, B, Bock, PE, Tans, G, Rosing, J, Nicolaes, GA. The role of thrombin exosites I and II in the activation of human coagulation factor V. *J Biol Chem* **2007**;282:33915-24.
86. Esmon, CT, Lollar, P. Involvement of thrombin anion-binding exosites 1 and 2 in the activation of factor V and factor VIII. *J Biol Chem* **1996**;271:13882-7.
87. Myles, T, Yun, TH, Leung, LL. Structural requirements for the activation of human factor VIII by thrombin. *Blood* **2002**;100:2820-6.
88. Sheehan, JP, Wu, Q, Tollefsen, DM, Sadler, JE. Mutagenesis of thrombin selectively modulates inhibition by serpins heparin cofactor II and antithrombin III. Interaction with the anion-binding exosite determines heparin cofactor II specificity. *J Biol Chem* **1993**;268:3639-45.
89. Stone, SR, Hofsteenge, J. Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry* **1986**;25:4622-8.
90. Dumas, JJ, Kumar, R, Seehra, J, Somers, WS, Mosyak, L. Crystal structure of the GpIb $\alpha$ -thrombin complex essential for platelet aggregation. *Science* **2003**;301:222-6.
91. Celikel, R, McClintock, RA, Roberts, JR, Mendolicchio, GL, Ware, J, Varughese, KI, Ruggeri, ZM. Modulation of  $\alpha$ -thrombin function by distinct interactions with platelet glycoprotein Ib $\alpha$ . *Science* **2003**;301:218-21.
92. Richardson, JL, Kroger, B, Hoeffken, W, Sadler, JE, Pereira, P, Huber, R, Bode, W, Fuentes-Prior, P. Crystal structure of the human  $\alpha$ -thrombin-haemadin complex: an exosite II-binding inhibitor. *Embo J* **2000**;19:5650-60.
93. Chen, R, Doolittle, RF.  $\gamma$ - $\gamma$  cross-linking sites in human and bovine fibrin. *Biochemistry* **1971**;10:4487-91.
94. Bajzar, L, Manuel, R, Nesheim, ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* **1995**;270:14477-84.
95. Naito, K, Fujikawa, K. Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces. *J Biol Chem* **1991**;266:7353-8.
96. Fulcher, CA, Roberts, JR, Zimmerman, TS. Thrombin proteolysis of purified factor VIII procoagulant protein: correlation of activation with generation of a specific polypeptide. *Blood* **1983**;61:807-11.
97. Kane, WH, Majerus, PW. Purification and characterization of human coagulation factor V. *J Biol Chem* **1981**;256:1002-7.
98. Majerus, PW, Miletich, JP. Relationships between platelets and coagulation factors in hemostasis. *Annu Rev Med* **1978**;29:41-9.

99. Bevers, EM, Comfurius, P, van Rijn, JL, Hemker, HC, Zwaal, RF. Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets. *Eur J Biochem* **1982**;122:429-36.
100. Vu, TK, Hung, DT, Wheaton, VI, Coughlin, SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **1991**;64:1057-68.
101. Kahn, ML, Zheng, YW, Huang, W, Bigornia, V, Zeng, D, Moff, S, Farese, RV, Jr., Tam, C, Coughlin, SR. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* **1998**;394:690-4.
102. Xu, WF, Andersen, H, Whitmore, TE, Presnell, SR, Yee, DP, Ching, A, Gilbert, T, Davie, EW, Foster, DC. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**;95:6642-6.
103. Ishihara, H, Connolly, AJ, Zeng, D, Kahn, ML, Zheng, YW, Timmons, C, Tram, T, Coughlin, SR. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* **1997**;386:502-6.
104. Nystedt, S, Emilsson, K, Wahlestedt, C, Sundelin, J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**;91:9208-12.
105. Coughlin, SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* **2000**;407:258-64.
106. Adam, F, Guillin, MC, Jandrot-Perrus, M. Glycoprotein Ib-mediated platelet activation. A signalling pathway triggered by thrombin. *Eur J Biochem* **2003**;270:2959-70.
107. Esmon, CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* **1989**;264:4743-6.
108. Hattori, R, Hamilton, KK, Fugate, RD, McEver, RP, Sims, PJ. Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem* **1989**;264:7768-71.
109. Daniel, TO, Gibbs, VC, Milfay, DF, Garovoy, MR, Williams, LT. Thrombin stimulates c-sis gene expression in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* **1986**;261:9579-82.
110. Colotta, F, Sciacca, FL, Sironi, M, Luini, W, Rabiet, MJ, Mantovani, A. Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am J Pathol* **1994**;144:975-85.
111. Gettins, PG. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* **2002**;102:4751-804.
112. Rosenberg, RD, Damus, PS. The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem* **1973**;248:6490-505.
113. Li, W, Johnson, DJ, Esmon, CT, Huntington, JA. Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nat Struct Mol Biol* **2004**;11:857-62.
114. Tollefsen, DM, Majerus, DW, Blank, MK. Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J Biol Chem* **1982**;257:2162-9.
115. Baker, JB, Low, DA, Simmer, RL, Cunningham, DD. Protease-nexin: a cellular component that links thrombin and plasminogen activator and mediates their binding to cells. *Cell* **1980**;21:37-45.
116. Macedo-Ribeiro, S, Almeida, C, Calisto, BM, Friedrich, T, Mentele, R, Sturzebecher, J, Fuentes-Prior, P, Pereira, PJ. Isolation, cloning and structural characterisation of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. *PLoS One* **2008**;3:e1624.

117. Corral-Rodriguez, MA, Macedo-Ribeiro, S, Pereira, PJ, Fuentes-Prior, P. Leech-derived thrombin inhibitors: from structures to mechanisms to clinical applications. *J Med Chem* **2010**;53:3847-61.
118. Figueiredo, AC, de Sanctis, D, Gutierrez-Gallego, R, Cereija, TB, Macedo-Ribeiro, S, Fuentes-Prior, P, Pereira, PJ. Unique thrombin inhibition mechanism by anophelin, an anticoagulant from the malaria vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**;109:E3649-58.
119. Lechtenberg, BC, Freund, SM, Huntington, JA. An ensemble view of thrombin allostery. *Biol Chem* **2012**;393:889-98.
120. Petrera, NS, Stafford, AR, Leslie, BA, Kretz, CA, Fredenburgh, JC, Weitz, JI. Long range communication between exosites 1 and 2 modulates thrombin function. *J Biol Chem* **2009**;284:25620-9.
121. Kamath, P, Huntington, JA, Krishnaswamy, S. Ligand binding shuttles thrombin along a continuum of zymogen- and proteinase-like states. *J Biol Chem* **2010**;285:28651-8.
122. Koeppe, JR, Komives, EA. Amide H/2H exchange reveals a mechanism of thrombin activation. *Biochemistry* **2006**;45:7724-32.
123. Silva Vde, A, Cargnelutti, MT, Giesel, GM, Palmieri, LC, Monteiro, RQ, Verli, H, Lima, LM. Structure and behavior of human alpha-thrombin upon ligand recognition: thermodynamic and molecular dynamics studies. *PLoS One* **2011**;6:e24735.
124. Croy, CH, Koeppe, JR, Bergqvist, S, Komives, EA. Allosteric changes in solvent accessibility observed in thrombin upon active site occupation. *Biochemistry* **2004**;43:5246-55.
125. Jenny, RJ, Pittman, DD, Toole, JJ, Kriz, RW, Aldape, RA, Hewick, RM, Kaufman, RJ, Mann, KG. Complete cDNA and derived amino acid sequence of human factor V. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**;84:4846-50.
126. Vehar, GA, Keyt, B, Eaton, D, Rodriguez, H, O'Brien, DP, Rotblat, F, Oppermann, H, Keck, R, Wood, WI, Harkins, RN, et al. Structure of human factor VIII. *Nature* **1984**;312:337-42.
127. Takahashi, N, Ortel, TL, Putnam, FW. Single-chain structure of human ceruloplasmin: the complete amino acid sequence of the whole molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1984**;81:390-4.
128. Church, WR, Jernigan, RL, Toole, J, Hewick, RM, Knopf, J, Knutson, GJ, Nesheim, ME, Mann, KG, Fass, DN. Coagulation factors V and VIII and ceruloplasmin constitute a family of structurally related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1984**;81:6934-7.
129. Gitschier, J, Wood, WI, Goralka, TM, Wion, KL, Chen, EY, Eaton, DH, Vehar, GA, Capon, DJ, Lawn, RM. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* **1984**;312:326-30.
130. Kane, WH, Davie, EW. Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood* **1988**;71:539-55.
131. Koschinsky, ML, Funk, WD, van Oost, BA, MacGillivray, RT. Complete cDNA sequence of human preceruloplasmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**;83:5086-90.
132. Ngo, JC, Huang, M, Roth, DA, Furie, BC, Furie, B. Crystal structure of human factor VIII: implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex. *Structure* **2008**;16:597-606.
133. Shen, BW, Spiegel, PC, Chang, CH, Huh, JW, Lee, JS, Kim, J, Kim, YH, Stoddard, BL. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood* **2008**;111:1240-7.
134. Macedo-Ribeiro, S, Bode, W, Huber, R, Quinn-Allen, MA, Kim, SW, Ortel, TL, Bourenkov, GP, Bartunik, HD, Stubbs, MT, Kane, WH, Fuentes-Prior, P. Crystal structures of the membrane-binding C2 domain of human coagulation factor V. *Nature* **1999**;402:434-9.

135. Pratt, KP, Shen, BW, Takeshima, K, Davie, EW, Fujikawa, K, Stoddard, BL. Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. *Nature* **1999**;402:439-42.
136. Fuentes-Prior, P, Fujikawa, K, Pratt, KP. New insights into binding interfaces of coagulation factors V and VIII and their homologues lessons from high resolution crystal structures. *Curr Protein Pept Sci* **2002**;3:313-39.
137. Adams, TE, Hockin, MF, Mann, KG, Everse, SJ. The crystal structure of activated protein C-inactivated bovine factor Va: Implications for cofactor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**;101:8918-23.
138. Zaitseva I., ZV, Card G., Moshkov K., Bax B., Ralph A., Lindley P. The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1Å: nature of the copper centres. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **1996**;1:15-23.
139. Hopfner, KP, Lang, A, Karcher, A, Sichler, K, Kopetzki, E, Brandstetter, H, Huber, R, Bode, W, Engh, RA. Coagulation factor IXa: the relaxed conformation of Tyr99 blocks substrate binding. *Structure* **1999**;7:989-96.
140. Brandstetter, H, Bauer, M, Huber, R, Lollar, P, Bode, W. X-ray structure of clotting factor IXa: active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**;92:9796-800.
141. Autin, L, Steen, M, Dahlback, B, Villoutreix, BO. Proposed structural models of the prothrombinase (FXa-FVa) complex. *Proteins* **2006**;63:440-50.
142. Tuddenham, EG, Schwaab, R, Seehafer, J, Millar, DS, Gitschier, J, Higuchi, M, Bidichandani, S, Connor, JM, Hoyer, LW, Yoshioka, A, et al. Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene, second edition. *Nucleic Acids Res* **1994**;22:3511-33.
143. Nogami, K, Wakabayashi, H, Schmidt, K, Fay, PJ. Altered interactions between the A1 and A2 subunits of factor VIIIa following cleavage of A1 subunit by factor Xa. *J Biol Chem* **2003**;278:1634-41.
144. Lillicrap, D. Extending half-life in coagulation factors: where do we stand? *Thromb Res* **2008**;122 Suppl 4:S2-8.
145. Lollar, P, Hill-Eubanks, DC, Parker, CG. Association of the factor VIII light chain with von Willebrand factor. *J Biol Chem* **1988**;263:10451-5.
146. Eaton, D, Rodriguez, H, Vehar, GA. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry* **1986**;25:505-12.
147. Newell, JL, Fay, PJ. Proteolysis at Arg740 facilitates subsequent bond cleavages during thrombin-catalyzed activation of factor VIII. *J Biol Chem* **2007**;282:25367-75.
148. Bajaj, SP, Schmidt, AE, Mathur, A, Padmanabhan, K, Zhong, D, Mastri, M, Fay, PJ. Factor IXa:factor VIIIa interaction. helix 330-338 of factor IXa interacts with residues 558-565 and spatially adjacent regions of the  $\alpha 2$  subunit of factor VIIIa. *J Biol Chem* **2001**;276:16302-9.
149. Hill-Eubanks, DC, Parker, CG, Lollar, P. Differential proteolytic activation of factor VIII-von Willebrand factor complex by thrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989**;86:6508-12.
150. Tagliavacca, L, Moon, N, Dunham, WR, Kaufman, RJ. Identification and functional requirement of Cu(I) and its ligands within coagulation factor VIII. *J Biol Chem* **1997**;272:27428-34.
151. Wakabayashi, H, Koszelak, ME, Mastri, M, Fay, PJ. Metal ion-independent association of factor VIII subunits and the roles of calcium and copper ions for cofactor activity and inter-subunit affinity. *Biochemistry* **2001**;40:10293-300.

152. Venkateswarlu, D. Structural investigation of zymogenic and activated forms of human blood coagulation factor VIII: a computational molecular dynamics study. *BMC Struct Biol* **2010**;10:7.
153. Lollar, P, Parker, ET, Fay, PJ. Coagulant properties of hybrid human/porcine factor VIII molecules. *J Biol Chem* **1992**;267:23652-7.
154. Gale, AJ, Pellequer, JL, Getzoff, ED, Griffin, JH. Structural basis for hemophilia A caused by mutations in the C domains of blood coagulation factor VIII. *Thromb Haemost* **2000**;83:78-85.
155. Yuan, QP, Walke, EN, Sheehan, JP. The factor IXa heparin-binding exosite is a cofactor interactive site: mechanism for antithrombin-independent inhibition of intrinsic tenase by heparin. *Biochemistry* **2005**;44:3615-25.
156. Saenko, EL, Ananyeva, NM, Kouliavskaia, DV, Khrenov, AV, Anderson, JA, Shima, M, Qian, J, Scott, D. Haemophilia A: effects of inhibitory antibodies on factor VIII functional interactions and approaches to prevent their action. *Haemophilia* **2002**;8:1-11.
157. Nogami, K, Lapan, KA, Zhou, Q, Wakabayashi, H, Fay, PJ. Identification of a factor Xa-interactive site within residues 337-372 of the factor VIII heavy chain. *J Biol Chem* **2004**;279:15763-71.
158. Nogami, K, Freas, J, Manithody, C, Wakabayashi, H, Rezaie, AR, Fay, PJ. Mechanisms of interactions of factor X and factor Xa with the acidic region in the factor VIII A1 domain. *J Biol Chem* **2004**;279:33104-13.
159. Griffiths, AE, Rydkin, I, Fay, PJ. Factor VIIIa A2 Subunit Shows a High Affinity Interaction with Factor IXa: Contribution of A2 Subunit Residues 707-714 to the Interaction with Factor IXa. *J Biol Chem* **2013**.
160. Fay, PJ, Mastri, M, Koszelak, ME, Wakabayashi, H. Cleavage of factor VIII heavy chain is required for the functional interaction of a2 subunit with factor IXA. *J Biol Chem* **2001**;276:12434-9.
161. Fay, PJ, Beattie, T, Huggins, CF, Regan, LM. Factor VIIIa A2 subunit residues 558-565 represent a factor IXa interactive site. *J Biol Chem* **1994**;269:20522-7.
162. Lenting, PJ, van de Loo, JW, Donath, MJ, van Mourik, JA, Mertens, K. The sequence Glu1811-Lys1818 of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX. *J Biol Chem* **1996**;271:1935-40.
163. Lapan, KA, Fay, PJ. Localization of a factor X interactive site in the A1 subunit of factor VIIIa. *J Biol Chem* **1997**;272:2082-8.
164. Nogami, K, Wakabayashi, H, Fay, PJ. Mechanisms of factor Xa-catalyzed cleavage of the factor VIIIa A1 subunit resulting in cofactor inactivation. *J Biol Chem* **2003**;278:16502-9.
165. Takeyama, M, Wakabayashi, H, Fay, PJ. Factor VIII light chain contains a binding site for factor X that contributes to the catalytic efficiency of factor Xase. *Biochemistry* **2012**;51:820-8.
166. Bukys, MA, Orban, T, Kim, PY, Beck, DO, Nesheim, ME, Kalafatis, M. 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**;281:18569-80.
167. Fay, PJ. Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. *Blood Rev* **2004**;18:1-15.
168. Newell, JL, Fay, PJ. Acidic residues C-terminal to the A2 domain facilitate thrombin-catalyzed activation of factor VIII. *Biochemistry* **2008**;47:8786-95.
169. Nogami, K, Zhou, Q, Myles, T, Leung, LL, Wakabayashi, H, Fay, PJ. Exosite-interactive regions in the A1 and A2 domains of factor VIII facilitate thrombin-catalyzed cleavage of heavy chain. *J Biol Chem* **2005**;280:18476-87.

170. Hoyer, LW. Molecular pathology and immunology of factor VIII (hemophilia A and factor VIII inhibitors). *Hum Pathol* **1987**;18:153-61.
171. Bitting, RL, Bent, S, Li, Y, Kohlwes, J. The prognosis and treatment of acquired hemophilia: a systematic review and meta-analysis. *Blood Coagul Fibrinolysis* **2009**;20:517-23.
172. Ehrenforth, S, Kreuz, W, Scharrer, I, Linde, R, Funk, M, Gungor, T, Krackhardt, B, Kornhuber, B. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. *Lancet* **1992**;339:594-8.
173. Toole, JJ, Knopf, JL, Wozney, JM, Sultzman, LA, Buecker, JL, Pittman, DD, Kaufman, RJ, Brown, E, Shoemaker, C, Orr, EC, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor. *Nature* **1984**;312:342-7.
174. Poustka, A, Dietrich, A, Langenstein, G, Toniolo, D, Warren, ST, Lehrach, H. Physical map of human Xq27-qter: localizing the region of the fragile X mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**;88:8302-6.
175. Jenkins, PV, Freas, J, Schmidt, KM, Zhou, Q, Fay, PJ. Mutations associated with hemophilia A in the 558-565 loop of the factor VIIIa A2 subunit alter the catalytic activity of the factor Xase complex. *Blood* **2002**;100:501-8.
176. Gitschier, J, Kogan, S, Levinson, B, Tuddenham, EG. Mutations of factor VIII cleavage sites in hemophilia A. *Blood* **1988**;72:1022-8.
177. Sadler, JE, Budde, U, Eikenboom, JC, Favaloro, EJ, Hill, FG, Holmberg, L, Ingerslev, J, Lee, CA, Lillicrap, D, Mannucci, PM, Mazurier, C, Meyer, D, Nichols, WL, Nishino, M, Peake, IR, Rodeghiero, F, Schneppenheim, R, Ruggeri, ZM, Srivastava, A, Montgomery, RR, Federici, AB. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost* **2006**;4:2103-14.
178. Pietu, G, Ribba, AS, de Paillette, L, Cherel, G, Lavergne, JM, Bahnak, BR, Meyer, D. Molecular study of von Willebrand disease: identification of potential mutations in patients with type IIA and type IIB. *Blood Coagul Fibrinolysis* **1992**;3:415-21.
179. Lavergne, JM, De Paillette, L, Bahnak, BR, Ribba, AS, Fressinaud, E, Meyer, D, Pietu, G. Defects in type IIA von Willebrand disease: a cysteine 509 to arginine substitution in the mature von Willebrand factor disrupts a disulphide loop involved in the interaction with platelet glycoprotein Ib-IX. *Br J Haematol* **1992**;82:66-72.
180. Hilbert, L, Gaucher, C, Abgrall, JF, Parquet, A, Trzeciak, C, Mazurier, C. Identification of new type 2B von Willebrand disease mutations: Arg543Gln, Arg545Pro and Arg578Leu. *Br J Haematol* **1998**;103:877-84.
181. Tracy, PB, Giles, AR, Mann, KG, Eide, LL, Hoogendoorn, H, Rivard, GE. Factor V (Quebec): a bleeding diathesis associated with a qualitative platelet Factor V deficiency. *J Clin Invest* **1984**;74:1221-8.
182. Hayward, CP, Cramer, EM, Kane, WH, Zheng, S, Bouchard, M, Masse, JM, Rivard, GE. Studies of a second family with the Quebec platelet disorder: evidence that the degradation of the alpha-granule membrane and its soluble contents are not secondary to a defect in targeting proteins to alpha-granules. *Blood* **1997**;89:1243-53.
183. Montefusco, MC, Duga, S, Asselta, R, Santagostino, E, Mancuso, G, Malcovati, M, Mannucci, PM, Tenchini, ML. A novel two base pair deletion in the factor V gene associated with severe factor V deficiency. *Br J Haematol* **2000**;111:1240-6.
184. Bertina, RM, Koeleman, BP, Koster, T, Rosendaal, FR, Dirven, RJ, de Ronde, H, van der Velden, PA, Reitsma, PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* **1994**;369:64-7.

185. Tran, S, Dahlback, B. Novel APC-cleavage sites in FVa provide insights into mechanisms of action of APC and its cofactor protein S. *J Thromb Haemost* **2009**;8:129-36.
186. Kalafatis, M, Bertina, RM, Rand, MD, Mann, KG. Characterization of the molecular defect in factor VR506Q. *J Biol Chem* **1995**;270:4053-7.
187. Nicolaes, GA, Tans, G, Thomassen, MC, Hemker, HC, Pabinger, I, Varadi, K, Schwarz, HP, Rosing, J. Peptide bond cleavages and loss of functional activity during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *J Biol Chem* **1995**;270:21158-66.
188. Kalafatis, M, Haley, PE, Lu, D, Bertina, RM, Long, GL, Mann, KG. Proteolytic events that regulate factor V activity in whole plasma from normal and activated protein C (APC)-resistant individuals during clotting: an insight into the APC-resistance assay. *Blood* **1996**;87:4695-707.
189. Rosing, J, Hoekema, L, Nicolaes, GA, Thomassen, MC, Hemker, HC, Varadi, K, Schwarz, HP, Tans, G. Effects of protein S and factor Xa on peptide bond cleavages during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *J Biol Chem* **1995**;270:27852-8.
190. Koster, T, Rosendaal, FR, de Ronde, H, Briet, E, Vandenbroucke, JP, Bertina, RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* **1993**;342:1503-6.
191. Greengard, JS, Sun, X, Xu, X, Fernandez, JA, Griffin, JH, Evatt, B. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *Lancet* **1994**;343:1361-2.
192. Sun, X, Evatt, B, Griffin, JH. Blood coagulation factor Va abnormality associated with resistance to activated protein C in venous thrombophilia. *Blood* **1994**;83:3120-5.
193. Voorberg, J, Roelse, J, Koopman, R, Buller, H, Berends, F, ten Cate, JW, Mertens, K, van Mourik, JA. Association of idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg506 of factor V. *Lancet* **1994**;343:1535-6.
194. Bajzar, L, Kalafatis, M, Simioni, P, Tracy, PB. An antifibrinolytic mechanism describing the prothrombotic effect associated with factor VLeiden. *J Biol Chem* **1996**;271:22949-52.
195. Broze, GJ, Jr., Higuchi, DA. Coagulation-dependent inhibition of fibrinolysis: role of carboxypeptidase-U and the premature lysis of clots from hemophilic plasma. *Blood* **1996**;88:3815-23.
196. Ishii, K, Gerszten, R, Zheng, YW, Welsh, JB, Turck, CW, Coughlin, SR. Determinants of thrombin receptor cleavage. Receptor domains involved, specificity, and role of the P3 aspartate. *J Biol Chem* **1995**;270:16435-40.
197. Myles, T, Le Bonniec, BF, Stone, SR. The dual role of thrombin's anion-binding exosite-I in the recognition and cleavage of the protease-activated receptor 1. *Eur J Biochem* **2001**;268:70-7.
198. Mathews, II, Padmanabhan, KP, Ganesh, V, Tulinsky, A, Ishii, M, Chen, J, Turck, CW, Coughlin, SR, Fenton, JW, 2nd. Crystallographic structures of thrombin complexed with thrombin receptor peptides: existence of expected and novel binding modes. *Biochemistry* **1994**;33:3266-79.
199. Seeley, S, Covic, L, Jacques, SL, Sudmeier, J, Baleja, JD, Kuliopulos, A. Structural basis for thrombin activation of a protease-activated receptor: inhibition of intramolecular liganding. *Chem Biol* **2003**;10:1033-41.
200. Esmon, CT. The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb Res* **2004**;114:321-7.



201. de Garavilla, L, Vergnolle, N, Young, SH, Ennes, H, Steinhoff, M, Ossovskaya, VS, D'Andrea, MR, Mayer, EA, Wallace, JL, Hollenberg, MD, Andrade-Gordon, P, Bunnett, NW. Agonists of proteinase-activated receptor 1 induce plasma extravasation by a neurogenic mechanism. *Br J Pharmacol* **2001**;133:975-87.
202. Dahlback, B, Villoutreix, BO. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett* **2005**;579:3310-6.
203. Riewald, M, Petrovan, RJ, Donner, A, Mueller, BM, Ruf, W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* **2002**;296:1880-2.
204. Flynn, AN, Buret, AG. Proteinase-activated receptor 1 (PAR-1) and cell apoptosis. *Apoptosis* **2004**;9:729-37.
205. Guo, H, Liu, D, Gelbard, H, Cheng, T, Insalaco, R, Fernandez, JA, Griffin, JH, Zlokovic, BV. Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron* **2004**;41:563-72.
206. De Marco, L, Mazzucato, M, Masotti, A, Fenton, JW, 2nd, Ruggeri, ZM. Function of glycoprotein Ib alpha in platelet activation induced by alpha-thrombin. *J Biol Chem* **1991**;266:23776-83.
207. Dormann, D, Clemetson, KJ, Kehrel, BE. The GPIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood* **2000**;96:2469-78.
208. Berndt, MC, Fournier, DJ, Castaldi, PA. Bernard-Soulier syndrome. *Baillieres Clin Haematol* **1989**;2:585-607.
209. Okumura, T, Hasitz, M, Jamieson, GA. Platelet glyocalicin. Interaction with thrombin and role as thrombin receptor of the platelet surface. *J Biol Chem* **1978**;253:3435-43.
210. De Cristofaro, R, De Candia, E, Landolfi, R, Rutella, S, Hall, SW. Structural and functional mapping of the thrombin domain involved in the binding to the platelet glycoprotein Ib. *Biochemistry* **2001**;40:13268-73.
211. De Marco, L, Mazzucato, M, Masotti, A, Ruggeri, ZM. Localization and characterization of an alpha-thrombin-binding site on platelet glycoprotein Ib alpha. *J Biol Chem* **1994**;269:6478-84.
212. Korzeniowski, OM, Kaye, D. Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine W. B. Saunders, Philadelphia, PA, 1992.
213. Friedrich, R, Panizzi, P, Fuentes-Prior, P, Richter, K, Verhamme, I, Anderson, PJ, Kawabata, S, Huber, R, Bode, W, Bock, PE. Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation. *Nature* **2003**;425:535-9.
214. Panizzi, P, Friedrich, R, Fuentes-Prior, P, Richter, K, Bock, PE, Bode, W. Fibrinogen substrate recognition by staphylocoagulase·(pro)thrombin complexes. *J Biol Chem* **2006**;281:1179-87.
215. Friedrich, R, Panizzi, P, Kawabata, S, Bode, W, Bock, PE, Fuentes-Prior, P. Structural basis for reduced staphylocoagulase-mediated bovine prothrombin activation. *J Biol Chem* **2006**;281:1188-95.
216. Rydel, TJ, Ravichandran, KG, Tulinsky, A, Bode, W, Huber, R, Roitsch, C, Fenton, JW, 2nd. The structure of a complex of recombinant hirudin and human alpha-thrombin. *Science* **1990**;249:277-80.
217. Chang, JY. Production, properties, and thrombin inhibitory mechanism of hirudin amino-terminal core fragments. *J Biol Chem* **1990**;265:22159-66.
218. Chang, JY. The hirudin-binding site of human alpha-thrombin. Identification of lysyl residues which participate in the combining site of hirudin-thrombin complex. *J Biol Chem* **1989**;264:7141-6.

219. Dodt, J, Machleidt, W, Seemuller, U, Maschler, R, Fritz, H. Isolation and characterization of hirudin isoinhibitors and sequence analysis of hirudin PA. *Biol Chem Hoppe Seyler* **1986**;367:803-11.
220. Jackman, MP, Parry, MA, Hofsteenge, J, Stone, SR. Intrinsic fluorescence changes and rapid kinetics of the reaction of thrombin with hirudin. *J Biol Chem* **1992**;267:15375-83.
221. Myles, T, Le Bonniec, BF, Betz, A, Stone, SR. Electrostatic steering and ionic tethering in the formation of thrombin-hirudin complexes: the role of the thrombin anion-binding exosite-I. *Biochemistry* **2001**;40:4972-9.
222. Mao, SJ, Yates, MT, Owen, TJ, Krstenansky, JL. Interaction of hirudin with thrombin: identification of a minimal binding domain of hirudin that inhibits clotting activity. *Biochemistry* **1988**;27:8170-3.
223. Konno, S, Fenton, JW, 2nd, Villanueva, GB. Analysis of the secondary structure of hirudin and the mechanism of its interaction with thrombin. *Arch Biochem Biophys* **1988**;267:158-66.
224. Krstenansky, JL, Owen, TJ, Yates, MT, Mao, SJ. Anticoagulant peptides: nature of the interaction of the C-terminal region of hirudin with a noncatalytic binding site on thrombin. *J Med Chem* **1987**;30:1688-91.
225. Krstenansky, JL, Mao, SJ. Antithrombin properties of C-terminus of hirudin using synthetic unsulfated N alpha-acetyl-hirudin45-65. *FEBS Lett* **1987**;211:10-6.
226. Naski, MC, Fenton, JW, 2nd, Maraganore, JM, Olson, ST, Shafer, JA. The COOH-terminal domain of hirudin. An exosite-directed competitive inhibitor of the action of alpha-thrombin on fibrinogen. *J Biol Chem* **1990**;265:13484-9.
227. Jandrot-Perrus, M, Huisse, MG, Krstenansky, JL, Bezeaud, A, Guillin, MC. Effect of the hirudin carboxy-terminal peptide 54-65 on the interaction of thrombin with platelets. *Thromb Haemost* **1991**;66:300-5.
228. Tsiang, M, Lentz, SR, Dittman, WA, Wen, D, Scarpati, EM, Sadler, JE. Equilibrium binding of thrombin to recombinant human thrombomodulin: effect of hirudin, fibrinogen, factor Va, and peptide analogues. *Biochemistry* **1990**;29:10602-12.
229. Richardson, JL, Fuentes-Prior, P, Sadler, JE, Huber, R, Bode, W. Characterization of the residues involved in the human alpha-thrombin-haemadin complex: an exosite II-binding inhibitor. *Biochemistry* **2002**;41:2535-42.
230. van de Locht, A, Lamba, D, Bauer, M, Huber, R, Friedrich, T, Kroger, B, Hoffken, W, Bode, W. Two heads are better than one: crystal structure of the insect derived double domain Kazal inhibitor rhodniin in complex with thrombin. *EMBO J* **1995**;14:5149-57.
231. Carter, WJ, Cama, E, Huntington, JA. Crystal structure of thrombin bound to heparin. *J Biol Chem* **2005**;280:2745-9.
232. Gan, ZR, Li, Y, Chen, Z, Lewis, SD, Shafer, JA. Identification of basic amino acid residues in thrombin essential for heparin-catalyzed inactivation by antithrombin III. *J Biol Chem* **1994**;269:1301-5.
233. Sheehan, JP, Sadler, JE. Molecular mapping of the heparin-binding exosite of thrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**;91:5518-22.
234. Tsiang, M, Jain, AK, Gibbs, CS. Functional requirements for inhibition of thrombin by antithrombin III in the presence and absence of heparin. *J Biol Chem* **1997**;272:12024-9.
235. Keller, FG, Ortel, TL, Quinn-Allen, MA, Kane, WH. Thrombin-catalyzed activation of recombinant human factor V. *Biochemistry* **1995**;34:4118-24.
236. Thorelli, E, Kaufman, RJ, Dahlback, B. Cleavage requirements for activation of factor V by factor Xa. *Eur J Biochem* **1997**;247:12-20.

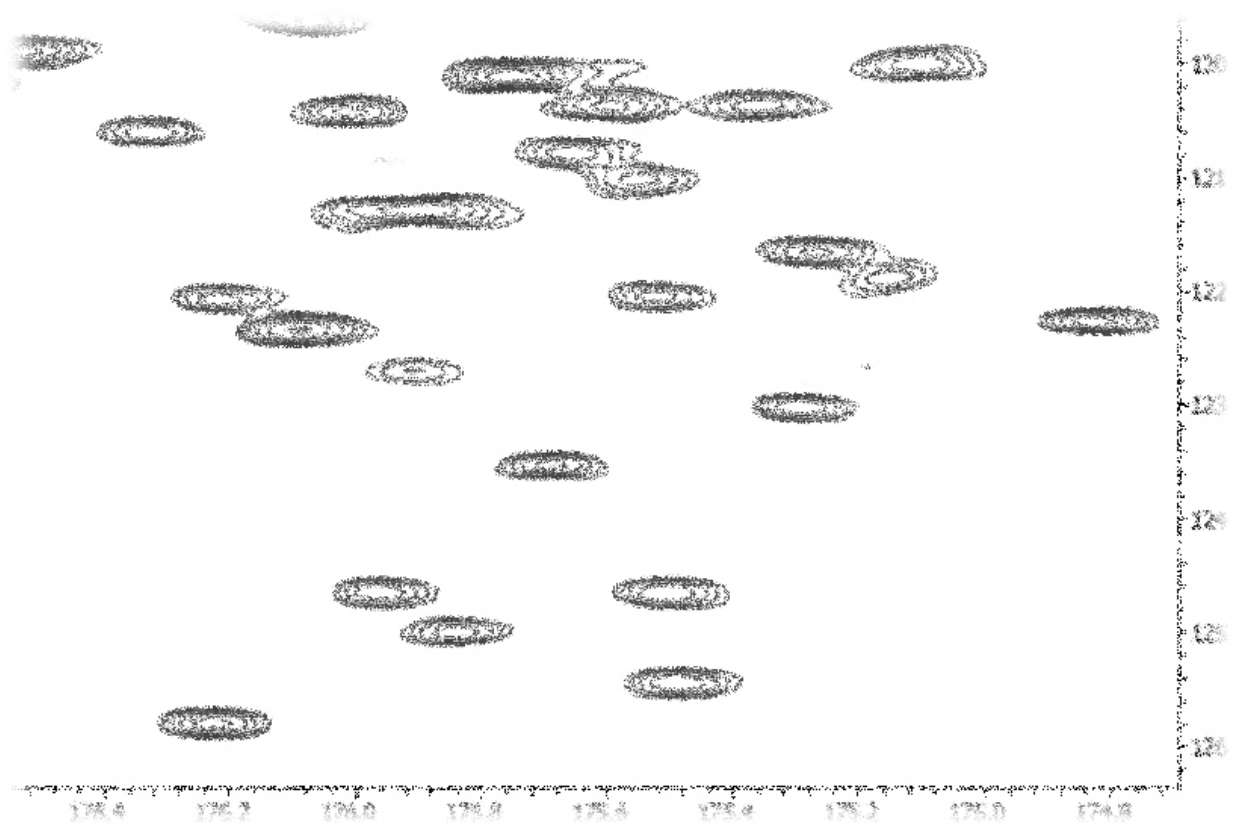
237. Marquette, KA, Pittman, DD, Kaufman, RJ. The factor V B-domain provides two functions to facilitate thrombin cleavage and release of the light chain. *Blood* **1995**;86:3026-34.
238. Bruylants, G, Wouters, J, Michaux, C. Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. *Curr Med Chem* **2005**;12:2011-20.
239. Gomez, J, Hilser, VJ, Xie, D, Freire, E. The heat capacity of proteins. *Proteins* **1995**;22:404-12.
240. Cummings, MD, Farnum, MA, Nelen, MI. Universal screening methods and applications of ThermoFluor. *J Biomol Screen* **2006**;11:854-63.
241. Niesen, FH, Berglund, H, Vedadi, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc* **2007**;2:2212-21.
242. Wilkins, MR, Gasteiger, E, Bairoch, A, Sanchez, JC, Williams, KL, Appel, RD, Hochstrasser, DF. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol* **1999**;112:531-52.
243. Strohm, M, Hassman, M, Kosata, B, Kodicek, M. mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2008**;22:905-8.
244. Pace, CN, Vajdos, F, Fee, L, Grimsley, G, Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* **1995**;4:2411-23.
245. Gasteiger, E, Gattiker, A, Hoogland, C, Ivanyi, I, Appel, RD, Bairoch, A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* **2003**;31:3784-8.
246. Schagger, H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* **2006**;1:16-22.
247. Schagger, H, von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1–100 kDalton. *Analytical Biochemistry* **1987**;166:368-379.
248. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**;227:680-5.
249. McLellan, T. Electrophoresis buffers for polyacrylamide gels at various pH. *Anal Biochem* **1982**;126:94-9.
250. Merril, CR, Washart, K. M. Protein detection methods. In: D. HB, ed. *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 1998:53-93.
251. Switzer, RC, 3rd, Merril, CR, Shifrin, S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **1979**;98:231-7.
252. Chayen, NE. Methods for separating nucleation and growth in protein crystallisation. *Prog Biophys Mol Biol* **2005**;88:329-37.
253. Chayen, NE, Saridakis, E. Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. *Nat Methods* **2008**;5:147-53.
254. Leslie, AGW. Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Joint CCP4 and ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography* **1992**;26:27-33.
255. Gabadinho, J, Beteva, A., Guijarro, M., Rey-Bakaikoa, V., Spruce, D., Bowler, M.W., Brockhauser, S., Flot, D., Gordon, E.J., Hall, D.R., Lavault, B., McCarthy, A.A., McCarthy, J., Mitchell, E., Monaco, S., Mueller-Dieckmann, C., Nurizzo D., Ravelli R.B.G., Thibault, X., Walsh, M.A., Leonarda, G.A., McSweeney, S.M. MxCuBE: a synchrotron beamline control environment customized for macromolecular crystallography experiments. *Journal of Synchrotron Radiation* **2010**;17.

256. Leslie, AG. The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2006**;62:48-57.
257. Battye, TG, Kontogiannis, L, Johnson, O, Powell, HR, Leslie, AG. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2011**;67:271-81.
258. Collaborative Computational Project, N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1994**;50:760-3.
259. Evans, PR. Data reduction. *Proceedings of CCP4 Study Weekend On DataCollection & Processing* **1993**:114-122.
260. Vagin, A, Teplyakov, A., . MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. *Journal of Applied Crystallography* **1997**;30:1022-1025
261. Emsley, P, Lohkamp, B, Scott, WG, Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**;66:486-501.
262. Murshudov, GN, Vagin, AA, Dodson, EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1997**;53:240-55.
263. Reid, DG, MacLachlan, LK, Edwards, AJ, Hubbard, JA, Sweeney, PJ. Introduction to the NMR of proteins. *Methods Mol Biol* **1997**;60:1-28.
264. Wuthrich, K. NMR studies of structure and function of biological macromolecules (Nobel Lecture). *J Biomol NMR* **2003**;27:13-39.
265. Lane, AN, Lefevre, JF. Nuclear magnetic resonance measurements of slow conformational dynamics in macromolecules. *Methods Enzymol* **1994**;239:596-619.
266. Case, DA, Dyson, HJ, Wright, PE. Use of chemical shifts and coupling constants in nuclear magnetic resonance structural studies on peptides and proteins. *Methods Enzymol* **1994**;239:392-416.
267. Delaglio, F, Grzesiek, S, Vuister, GW, Zhu, G, Pfeifer, J, Bax, A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* **1995**;6:277-93.
268. Dahlgren, A, Branalt, J, Kvarnstrom, I, Nilsson, I, Musil, D, Samuelsson, B. Synthesis of potential thrombin inhibitors. Incorporation of tartaric acid templates as P2 proline mimetics. *Bioorg Med Chem* **2002**;10:1567-80.
269. Mitchell, WM. Cleavage at arginine residues by clostripain. *Methods Enzymol* **1977**;47:165-70.
270. Saenko, EL, Scandella, D. The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von willebrand factor. *J Biol Chem* **1997**;272:18007-14.
271. Notredame, C, Higgins, DG, Heringa, J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* **2000**;302:205-17.
272. Poirot, O, O'Toole, E, Notredame, C. Tcoffee@igs: A web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments. *Nucleic Acids Res* **2003**;31:3503-6.
273. Wilkins, MR, Lindskog, I, Gasteiger, E, Bairoch, A, Sanchez, JC, Hochstrasser, DF, Appel, RD. Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS--a World-Wide-Web-accessible tool. *Electrophoresis* **1997**;18:403-8.
274. Lundblad R.L., FJW, Mann K.G. Chemistry and biology of thrombin Ann Arbor Science Publishers, 1977.
275. Fenton, JW, 2nd, Fasco, MJ, Stackrow, AB. Human thrombins. Production, evaluation, and properties of alpha-thrombin. *J Biol Chem* **1977**;252:3587-98.

276. Kantardjieff, KA, Rupp, B. Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Sci* **2003**;12:1865-71.
277. Matthews, BW. Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* **1968**;33:491-7.
278. Takeuchi, K, Heffron, G, Sun, ZY, Frueh, DP, Wagner, G. Nitrogen-detected CAN and CON experiments as alternative experiments for main chain NMR resonance assignments. *J Biomol NMR* **2010**;47:271-82.
279. Richardson, JS. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv Protein Chem* **1981**;34:167-339.
280. Novokhatny, VV, Kudinov, SA, Privalov, PL. Domains in human plasminogen. *J Mol Biol* **1984**;179:215-32.
281. Papaconstantinou, ME, Gandhi, PS, Chen, Z, Bah, A, Di Cera, E. Na<sup>+</sup> binding to meizothrombin desF1. *Cell Mol Life Sci* **2008**;65:3688-97.
282. Chen, JM, Rawlings, ND, Stevens, RA, Barrett, AJ. Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases. *FEBS Lett* **1998**;441:361-5.
283. Rawlings, ND, Barrett, AJ, Bateman, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* **2012**;40:D343-50.
284. Igarashi, Y, Eroshkin, A, Gramatikova, S, Gramatikoff, K, Zhang, Y, Smith, JW, Osterman, AL, Godzik, A. CutDB: a proteolytic event database. *Nucleic Acids Res* **2007**;35:D546-9.
285. Eichinger, A, Beisel, HG, Jacob, U, Huber, R, Medrano, FJ, Banbula, A, Potempa, J, Travis, J, Bode, W. Crystal structure of gingipain R: an Arg-specific bacterial cysteine proteinase with a caspase-like fold. *Embo J* **1999**;18:5453-62.
286. Bock, PE, Olson, ST, Bjork, I. Inactivation of thrombin by antithrombin is accompanied by inactivation of regulatory exosite I. *J Biol Chem* **1997**;272:19837-45.
287. Fredenburgh, JC, Stafford, AR, Weitz, JI. Conformational changes in thrombin when complexed by serpins. *J Biol Chem* **2001**;276:44828-34.
288. Li, W, Johnson, DJ, Adams, TE, Pozzi, N, De Filippis, V, Huntington, JA. Thrombin inhibition by serpins disrupts exosite II. *J Biol Chem* **2010**;285:38621-9.
289. Gandhi, PS, Chen, Z, Mathews, FS, Di Cera, E. Structural identification of the pathway of long-range communication in an allosteric enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**;105:1832-7.
290. Liu, CC, Brustad, E, Liu, W, Schultz, PG. Crystal structure of a biosynthetic sulfo-hirudin complexed to thrombin. *J Am Chem Soc* **2007**;129:10648-9.
291. Betz, A, Hofsteenge, J, Stone, SR. Role of interactions involving C-terminal nonpolar residues of hirudin in the formation of the thrombin-hirudin complex. *Biochemistry* **1991**;30:9848-53.
292. Cheng, Y, Slon-Usakiewicz, JJ, Wang, J, Purisima, EO, Konishi, Y. Nonpolar interactions of thrombin and its inhibitors at the fibrinogen recognition exosite: thermodynamic analysis. *Biochemistry* **1996**;35:13021-9.
293. Malojcic, G, Owen, RL, Grimshaw, JP, Brozzo, MS, Dreher-Teo, H, Glockshuber, R. A structural and biochemical basis for PAPS-independent sulfuryl transfer by aryl sulfotransferase from uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**;105:19217-22.
294. Vincent, C, Doublet, P, Grangeasse, C, Vaganay, E, Cozzone, AJ, Duclos, B. Cells of *Escherichia coli* contain a protein-tyrosine kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb. *J Bacteriol* **1999**;181:3472-7.

- 
295. Vincent, C, Duclos, B, Grangeasse, C, Vaganay, E, Riberty, M, Cozzzone, AJ, Doublet, P. Relationship between exopolysaccharide production and protein-tyrosine phosphorylation in gram-negative bacteria. *J Mol Biol* **2000**;304:311-21.
  296. Enami, M, Ishihama, A. Protein phosphorylation in Escherichia coli and purification of a protein kinase. *J Biol Chem* **1984**;259:526-33.
  297. Rosen, R, Becher, D, Buttner, K, Biran, D, Hecker, M, Ron, EZ. Highly phosphorylated bacterial proteins. *Proteomics* **2004**;4:3068-77.
  298. Pittman, DD, Wang, JH, Kaufman, RJ. Identification and functional importance of tyrosine sulfate residues within recombinant factor VIII. *Biochemistry* **1992**;31:3315-25.
  299. Michnick, DA, Pittman, DD, Wise, RJ, Kaufman, RJ. Identification of individual tyrosine sulfation sites within factor VIII required for optimal activity and efficient thrombin cleavage. *J Biol Chem* **1994**;269:20095-102.
  300. Wider, G. Structure determination of biological macromolecules in solution using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biotechniques* **2000**;29:1278-82, 1284-90, 1292 *passim*.
  301. Craik, DJ, Wilce, JA. Studies of protein-ligand interactions by NMR. *Methods Mol Biol* **1997**;60:195-232.
  302. Lian, LY, Barsukov, IL, Sutcliffe, MJ, Sze, KH, Roberts, GC. Protein-ligand interactions: exchange processes and determination of ligand conformation and protein-ligand contacts. *Methods Enzymol* **1994**;239:657-700.
  303. Barrow, RT, Healey, JF, Lollar, P. Inhibition by heparin of thrombin-catalyzed activation of the factor VIII-von Willebrand factor complex. *J Biol Chem* **1994**;269:593-8.





## 8. ANEXOS





## Anexo 1: Estructuras 3D de trombina reportadas

Las estructuras de trombina reportadas se enlistan en orden creciente de simetría del grupo espacial; en los casos de estructuras isomórficas se presenta la mayor y menor dimensión de celda. En un gran número de casos, la trombina ha sido co-cristalizada con péptidos derivados de la región C-terminal del inhibidor natural de la trombina, la hirudina (usualmente, incluyen los residuos 54-65 o 55-64), estos péptidos se indican como Hir(54-65).

Las cuatro estructuras tridimensionales de trombina con las dimensiones de celda no reportadas, obtenidas en este trabajo, junto con la recopilación exhaustiva presentada en esta tabla son parte de uno de los manuscritos en preparación para la publicación de los resultados de esta investigación de doctorado.

**Supplemental Table 1.** Summary of reported thrombin structures.

| PDB code<br>/ Res. (Å)                                                                       | Asymmetric unit content                                                                                               | Interactions with                                                                         |                                                                                                                   | Ref.         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
|                                                                                              |                                                                                                                       | Active site region                                                                        | Exosite I                                                                                                         |              |
| Triclinic (P1)<br>a = 46.33 Å, b = 50.17 Å, c = 85.50 Å, α = 76.39°, β = 83.93°, γ = 73.74°  |                                                                                                                       |                                                                                           |                                                                                                                   |              |
| 3LU9/ 1.80                                                                                   | S195A mutant of human thrombin bound to PAR1 residues Ala <sup>33</sup> –Glu <sup>57</sup> . (Two complex molecules). | PAR1 residues Asn <sup>35</sup> (P <sub>7</sub> ) – Arg <sup>46</sup> (P <sub>5</sub> ’). | PAR1 residues Tyr <sup>52</sup> –Glu <sup>57</sup> . Fully defined.                                               | <sup>1</sup> |
| Triclinic (P1)<br>a = 52.21 Å, b = 62.26 Å, c = 67.51 Å, α = 99.38°, β = 110.46°, γ = 92.26° |                                                                                                                       |                                                                                           |                                                                                                                   |              |
| 3P6Z/ 1.69                                                                                   | FPR-inhibited human α-thrombin bound to acidic A2–B domain linker of human FV. (Two complex molecules).               | FPR moiety covalently linked to His <sup>57</sup> Nε2 and Ser <sup>195</sup> Oγ.          | Factor V residues Glu <sup>666</sup> –Glu <sup>672</sup> /Ser <sup>673</sup> .                                    | <sup>2</sup> |
| Triclinic (P1)<br>a = 62.24 Å, b = 68.23 Å, c = 98.97 Å, α = 72.57°, β = 84.05°, γ = 80.45°  |                                                                                                                       |                                                                                           |                                                                                                                   |              |
| 3P70/ 2.55                                                                                   | Benzamidine-inhibited human α-thrombin bound to acidic A2–B domain linker of human FV. (Four complex molecules).      | Benzamidine occupies S <sub>1</sub> pocket, other subsites empty.                         | Factor V residues Glu <sup>666</sup> /Ile <sup>667</sup> –Pro <sup>671</sup> .                                    | <sup>2</sup> |
| Monoclinic (P2)<br>a = 121.67 Å, b = 50.57 Å, c = 129.74 Å, β = 114.76°                      |                                                                                                                       |                                                                                           |                                                                                                                   |              |
| 1E0F/ 3.10                                                                                   | Human α-thrombin bound to haemadin. (Three complex molecules).                                                        | N-terminal peptide of the inhibitor (Ile <sup>1</sup> –Val <sup>8</sup> ).                | Major contacts with COOH-terminal tail from neighbouring haemadin moiety (Glu <sup>46</sup> –Ile <sup>52</sup> ). | <sup>3</sup> |
|                                                                                              |                                                                                                                       |                                                                                           |                                                                                                                   |              |

| <b>Monoclinic (P<sub>2</sub><sub>1</sub>)</b><br>$a = 71.20 \text{ \AA}, b = 74.50 \text{ \AA}, c = 83.40 \text{ \AA}, \beta = 92.50^\circ$   |                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| 1BTH/ 2.30                                                                                                                                    | Bovine thrombin (Glu192Gln mutant) bound to bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI). (Two complex molecules).                                                                                                            | Reactive site loop of the inhibitor (residues Pro <sup>13</sup> –Ile <sup>18</sup> , positions P <sub>3</sub> –P <sub>3</sub> ').                                                                                                                                                                                                                                                                            | Extensive interactions with a symmetry-related thrombin molecule (Glu <sup>127</sup> –Tyr <sup>134</sup> , Phe <sup>204A</sup> ).                                                                                                                                                                                                        | 4 |
| <b>Monoclinic (P<sub>2</sub><sub>1</sub>)</b><br>$a = 71.23 \text{ \AA}, b = 76.58 \text{ \AA}, c = 97.32 \text{ \AA}, \beta = 106.64^\circ$  |                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |   |
| 1JOU/ 1.80                                                                                                                                    | Human thrombin, Ser195Ala mutant (Three molecules).                                                                                                                                                                         | AB: occupied by COOH-terminus of neighbour light chain in substrate-like manner (Ile <sup>14K</sup> –Arg <sup>15</sup> occupy positions P <sub>4</sub> –P <sub>1</sub> ).<br><br>CD: occupied by COOH-terminus of light chain from symmetry-related molecule in substrate-like manner (Ile <sup>14K</sup> –Arg <sup>15</sup> occupy positions P <sub>4</sub> –P <sub>1</sub> ).<br><br>EF: essentially free. | AB: contacts intermediate helix and light chain from symmetry-related molecule (Arg <sup>126</sup> , Glu <sup>127</sup> ).<br><br>CD: no crystal contacts, however fully defined by electron density.<br><br>EF: extensive contacts with both heavy and light chain residues from symmetry-related molecule, in particular with 37-loop. | 5 |
| <b>Monoclinic (P<sub>2</sub><sub>1</sub>)</b><br>$a = 54.07 \text{ \AA}, b = 81.26 \text{ \AA}, c = 85.46 \text{ \AA}, \beta = 101.62^\circ$  |                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |   |
| 1DE7/ 2.00                                                                                                                                    | Human thrombin bound to CMK derivative of FXIII activation peptide, residues Thr <sup>28</sup> –Arg <sup>37</sup> . (Two complex molecules).                                                                                | FXIII activation peptide covalently linked to His <sup>57</sup> Nε2 and Ser <sup>195</sup> Oγ.                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Extensive contacts with symmetry-related thrombin molecule (Arg <sup>126</sup> , Glu <sup>127</sup> , Phe <sup>204A</sup> ).                                                                                                                                                                                                             | 6 |
| <b>Monoclinic (P<sub>2</sub><sub>1</sub>)</b><br>$a = 82.47 \text{ \AA}, b = 88.78 \text{ \AA}, c = 98.55 \text{ \AA}, \beta = 106.21^\circ$  |                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |   |
| 1UCY/ 2.20                                                                                                                                    | Bovine thrombin bound to Fbg Aα chain residues Asp <sup>7</sup> to Arg <sup>19</sup> ; N atom of Gly <sup>17</sup> replaced by C to avoid proteolysis. (Three complex molecules; two with α-thrombin, one with ε-thrombin). | Fully occupied by Fbg Aα chain residues in all three thrombin molecules (from P <sub>10</sub> to P <sub>3</sub> ').                                                                                                                                                                                                                                                                                          | H: minor contacts with light chain from a neighbouring molecule (Glu <sup>14L</sup> ); fully defined.<br><br>K: apical residues make major contacts with 60-loop and bound Fbg peptide from a neighbouring complex molecule.<br><br>N: only weak contacts with light chain from a neighbouring molecule.                                 | 7 |
| <b>Monoclinic (P<sub>2</sub><sub>1</sub>)</b><br>$a = 80.91 \text{ \AA}, b = 80.84 \text{ \AA}, c = 114.14 \text{ \AA}, \beta = 101.05^\circ$ |                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |   |
| 1XMN/ 1.85                                                                                                                                    | FPR-inhibited human α-thrombin bound to heparin fragment of eight monosaccharides. (Four complex molecules).                                                                                                                | FPR moiety.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Extensive contacts with light chain, intermediate helix, 204-loop (Phe <sup>204A</sup> ), and COOH-terminal helix from a symmetry-related molecule.                                                                                                                                                                                      | 8 |

| Monoclinic (C2)                                                                     |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                      |               |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| a = 68.94 – 72.47 Å, b = 70.90 – 73.52 Å, c = 71.31 – 73.80 Å, β = 99.34 – 101.85°  |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                      |               |
| 2BVR/ 1.25 <sup>a</sup>                                                             | Human α-thrombin bound to either hirudin COOH-terminal tail (Tyr <sup>63</sup> sulphated or not) and active site-directed inhibitor, or to hirudin peptidomimetic. (One complex molecule). | Synthetic inhibitor or NH <sub>2</sub> -terminal region of hirudin peptidomimetic (in several cases covalently bound to Ser <sup>195</sup> Oγ). | Hirudin residues Asp <sup>55</sup> –Leu <sup>64</sup> ; apical residues of the 70-80 loop also contact exosite I from a symmetry-related molecule.                   | <sup>9</sup>  |
| Monoclinic (C2)                                                                     |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                      |               |
| a = 70.66 – 72.85 Å, b = 71.32 – 72.47 Å, c = 72.63 – 73.52 Å, β = 100.75 – 101.26° |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                      |               |
| 1HAG/ 2.00 <sup>b</sup>                                                             | Human prethrombin-2 or thrombin bound to Hir(55-64) or Hir(55-64)(SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ). (One complex molecule).                                                                  | Free.                                                                                                                                           | Hirudin residues Asp <sup>55</sup> –Leu <sup>64</sup> ; apical residues of the 70-80 loop also contact exosite I from a symmetry-related molecule.                   | <sup>10</sup> |
| Monoclinic (C2)                                                                     |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                      |               |
| a = 70.97 Å, b = 72.50 Å, c = 72.57 Å, β = 100.50°                                  |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                      |               |
| 1HAI/ 2.40                                                                          | Human thrombin, irreversibly inhibited with FPR.                                                                                                                                           | FPR moiety.                                                                                                                                     | Contacts 70-80 loop from a symmetry-related molecule.                                                                                                                | <sup>11</sup> |
| Monoclinic (C2)                                                                     |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                      |               |
| a = 70.88 Å, b = 71.96 Å, c = 73.04 Å, β = 100.65°                                  |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                      |               |
| 1VR1/ 1.90                                                                          | Thrombin-TPA chimera; 37-loop swapped from tPA. Bound to Hir(55-64)(SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ). (One complex molecule).                                                                | Free.                                                                                                                                           | Hir(55-64)(SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ); also makes important contacts with exosite I from a symmetry-related molecule (70-80 loop). 37-loop disordered.           | <sup>11</sup> |
| Monoclinic (C2)                                                                     |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                      |               |
| a = 119.98 Å, b = 47.67 Å, c = 50.69 Å, β = 92.29°                                  |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                      |               |
| 3JZ1/ 1.60                                                                          | Human thrombin, Asn143Pro mutant, Na <sup>+</sup> -bound. (One molecule).                                                                                                                  | Extensive contacts between 60-loop residues and Trp <sup>215</sup> with 37-loop and neighbouring residues from a symmetry-related molecule.     | Free, partially disordered.                                                                                                                                          | <sup>54</sup> |
| Monoclinic (C2)                                                                     |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                      |               |
| a = 128.10 Å, b = 51.10 Å, c = 63.00 Å, β = 100.0°                                  |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                      |               |
| 1NRP/ 3.00                                                                          | Human α-thrombin bound to PAR1-derived peptide, Leu <sup>38</sup> -Glu <sup>60</sup> ; Arg <sup>41</sup> (P <sub>1</sub> ) replaced by β-homoarginine. (One complex molecule).             | PAR1 residues Leu <sup>38</sup> –Ser <sup>42</sup> .                                                                                            | PAR1 residues from a crystal neighbour (Tyr <sup>52</sup> , Phe <sup>55</sup> ) occupy “lower” exosite I; additional contacts with neighbouring thrombin molecule.   | <sup>55</sup> |
| Monoclinic (C2)                                                                     |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                      |               |
| a = 71.30 Å, b = 72.20 Å, c = 72.30 Å, β = 100.0°                                   |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                      |               |
| 1NRR/ 2.40                                                                          | FPR-inhibited human α-thrombin bound to PAR1-derived peptide, Phe <sup>42</sup> -Glu <sup>60</sup> . (One complex molecule).                                                               | FPR moiety covalently linked to His <sup>57</sup> Nε2 and Ser <sup>195</sup> Oγ.                                                                | PAR1 residues Lys <sup>51</sup> –Phe <sup>55</sup> occupy “lower” exosite I; extensive contacts with a symmetry-related molecule (in particular with its exosite I). | <sup>55</sup> |

|                                                                                                                                            |                                                                                                                                       |                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Orthorhombic (P<sub>2</sub><sub>1</sub>2<sub>1</sub>2)</b><br>a = 62.98 Å, b = 117.52 Å, c = 47.99 Å                                    |                                                                                                                                       |                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
| 1DOJ/ 1.70                                                                                                                                 | Human thrombin bound to Hir(55-65)(SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) and RWJ-51438. (One complex molecule).                              | Synthetic inhibitor RWJ-51438, covalently linked to Ser <sup>195</sup> Oγ.                      | Hirudin residues Asp <sup>55</sup> –Leu <sup>64</sup> ; also makes some contacts with symmetry-related molecule.                                                                                                                                                    | 12 |
| <b>Orthorhombic (P<sub>2</sub><sub>1</sub>2<sub>1</sub>2)</b><br>a = 80.50 Å, b = 107.10 Å, c = 45.80 Å                                    |                                                                                                                                       |                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
| 1TMT/ 2.20                                                                                                                                 | Human α-thrombin bound to hirudin peptidomimetic, CGP 50,856. (One complex molecule).                                                 | FPR moiety.                                                                                     | Hirudin residues Asp <sup>55</sup> –Leu <sup>64</sup> ; major additional contacts with symmetry-related thrombin molecule.                                                                                                                                          | 56 |
| <b>Orthorhombic (P<sub>2</sub><sub>1</sub>2<sub>1</sub>2)</b><br>a = 108.97 Å, b = 80.92 Å, c = 46.17 Å                                    |                                                                                                                                       |                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
| 1HDT/ 2.60                                                                                                                                 | Human thrombin bound to Hir(54-65) and synthetic inhibitor BMS-183507. (One complex molecule).                                        | Peptidyl inhibitor in “retro-binding” mode (parallel binding mode).                             | Hir(54-65) / Contacts in addition intermediate helix from a symmetry-related molecule.                                                                                                                                                                              | 57 |
| <b>Orthorhombic (P<sub>2</sub><sub>1</sub>2<sub>1</sub>2)</b><br>a = 108.17 Å, b = 81.22 Å, c = 46.00 Å                                    |                                                                                                                                       |                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
| 1BMM/ 2.60                                                                                                                                 | Human thrombin bound to Hir(54-65) and synthetic inhibitor BMS-186282. (One complex molecule).                                        | Peptidyl inhibitor in antiparallel beta-strand arrangement.                                     | Hir(55-63) / Also contacts exosite I from a symmetry-related molecule.                                                                                                                                                                                              | 58 |
| <b>Orthorhombic (P<sub>2</sub><sub>1</sub>2<sub>1</sub>2)</b><br>a = 167.78 Å, b = 49.04 Å, c = 43.79 Å                                    |                                                                                                                                       |                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
| 1BMN/ 2.80                                                                                                                                 | Human thrombin bound to Hir(54-65) and synthetic inhibitors BMS-189090. (One complex molecule).                                       | Peptidyl inhibitor in antiparallel beta-strand arrangement.                                     | Hir(55-63) / Also contacts exosite I from a symmetry-related molecule.                                                                                                                                                                                              | 58 |
| <b>Orthorhombic (P<sub>2</sub><sub>1</sub>2<sub>1</sub>2)</b><br>a = 83.77 Å, b = 134.02 Å, c = 44.03 Å                                    |                                                                                                                                       |                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
| 3DD2/ 1.90                                                                                                                                 | FPR-inhibited thrombin bound to exosite II-directed RNA aptamer. (One complex molecule).                                              | FPR moiety.                                                                                     | Bound hexaethylen glycol molecule + extensive interactions with both protein and RNA moieties from a symmetry-related molecule.                                                                                                                                     | 59 |
| <b>Orthorhombic (P<sub>2</sub><sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>)</b><br>a = 47.10 Å, b = 111.77 Å, c = 176.25 Å                       |                                                                                                                                       |                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
| 1P8V/ 2.60                                                                                                                                 | Complex of platelet receptor GPIB-α and α-thrombin. (One complex molecule).                                                           | Diisopropyl phosphonate (cross linker).                                                         | Major contacts with Leucine Rich Region (LRR) and Cys <sup>209</sup> –Cys <sup>264</sup> SS-bond of COOH-terminal region from a symmetry-related GPIB-α molecule.<br><br>(Arg <sup>123</sup> –Leu <sup>129</sup> α-helix of GPIB-α receptor interact at exosite II) | 60 |
| <b>Orthorhombic (P<sub>2</sub><sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>)</b><br>a = 49.71 – 50.60 Å, b = 73.55 – 73.70 Å, c = 89.77 – 90.10 Å |                                                                                                                                       |                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
| 1Z8I/ 2.00 <sup>g</sup>                                                                                                                    | Human thrombin mutants G193A, G193P, Y225I, or double mutant (W215A, E217A), irreversibly inhibited with FPR. (One complex molecule). | D-Phe-Pro-Arg tripeptide, covalently linked to Ser <sup>195</sup> Oγ and His <sup>57</sup> Nε2. | Minor contacts with symmetry-related molecule (Asp <sup>186A</sup> ), 70-80 loop partially disordered.                                                                                                                                                              | 13 |

|                                                                                                                                   |                                                                                            |                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                     |               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>Orthorhombic (P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>)</b><br>a = 51.11 Å, b = 73.83 Å, c = 87.33 Å                           |                                                                                            |                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                     |               |
| 1TQ7/ 2.40                                                                                                                        | Anticoagulant thrombin mutant W215A/E217A.                                                 | FPR moiety.                                                                                                  | Minor contacts with symmetry-related molecule (Asp <sup>186A</sup> ), 70-80 loop partially disordered.                                                                                                                                                              | <sup>74</sup> |
| <b>Orthorhombic (P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>)</b><br>a = 53.10 Å, b = 75.10 Å, c = 82.40 Å                           |                                                                                            |                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                     |               |
| 1THP/ 2.10                                                                                                                        | Y225P thrombin, irreversibly inhibited with FPR. (One molecule).                           | FPR moiety.                                                                                                  | Minor contacts with symmetry-related molecule (Asp <sup>170</sup> ).                                                                                                                                                                                                | <sup>61</sup> |
| <b>Orthorhombic (P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>)</b><br>a = 56.52 – 58.28 Å, b = 77.44 – 77.61 Å, c = 99.52 – 100.02 Å  |                                                                                            |                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                     |               |
| 1HAO <sup>e</sup> / 2.80                                                                                                          | Human thrombin, FPR-inhibited and bound to different DNA aptamers. (One complex molecule). | D-Phe-Pro-Arg tripeptide, covalently linked to Ser <sup>195</sup> Oγ and His <sup>57</sup> Nε2.              | Oligonucleotide (15-mer).                                                                                                                                                                                                                                           | <sup>62</sup> |
| <b>Orthorhombic (P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>)</b><br>a = 73.23 Å, b = 107.62 Å, c = 136.03 Å                         |                                                                                            |                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                     |               |
| 1RD3/ 2.50                                                                                                                        | Anticoagulant thrombin variant E217K. (Two molecules).                                     | Free.                                                                                                        | B: Extensive contacts with symmetry-related thrombin molecule (Arg <sup>126</sup> , Glu <sup>127</sup> , Phe <sup>204A</sup> ).<br>D: Extensive contacts with light chain from a neighbouring molecule (Lys <sup>10</sup> -Glu <sup>14H</sup> )                     | <sup>63</sup> |
| <b>Orthorhombic (P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>)</b><br>a = 88.26 Å, b = 68.02 Å, c = 61.22 Å                           |                                                                                            |                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                     |               |
| 1ABJ/ 2.40                                                                                                                        | Human α-thrombin, irreversibly inhibited with FPR. (One complex molecule).                 | FPR moiety covalently linked to Ser <sup>195</sup> Oγ and His <sup>57</sup> Nε2.                             | Important contacts with symmetry-related molecule.                                                                                                                                                                                                                  | <sup>64</sup> |
| <b>Orthorhombic (P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>)</b><br>a = 40.14 Å, b = 60.01 Å, c = 120.0 Å                           |                                                                                            |                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                     |               |
| 3EE0/ 2.75                                                                                                                        | W215A/E217A mutant of human thrombin. (One molecule).                                      | Free.                                                                                                        | Extensive contacts with light chain from a neighbouring molecule (Lys <sup>10</sup> -Glu <sup>14H</sup> )                                                                                                                                                           | <sup>65</sup> |
| <b>Orthorhombic (P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>)</b><br>a = 88.41 Å, b = 88.40 Å, c = 117.22 Å                          |                                                                                            |                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                     |               |
| 1TB6/ 2.50                                                                                                                        | Antithrombin-thrombin-heparin mimetic (SR123781) ternary complex. (One complex molecule).  | Reactive center loop of antithrombin (residues Ile <sup>422</sup> -Asp <sup>428</sup> ; position P4 to P3'). | Important contacts with Pro <sup>346</sup> -Glu <sup>347</sup> and Asp <sup>360</sup> -Leu <sup>362</sup> loops from a neighbouring antithrombin molecule.                                                                                                          | <sup>66</sup> |
| <b>Orthorhombic (P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>)</b><br>a = 58.51 – 61.34 Å, b = 68.20 – 69.74 Å, c = 158.16 – 162.93 Å |                                                                                            |                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                     |               |
| 1SHH/ 1.55 <sup>%</sup>                                                                                                           | FPR-inhibited human α-thrombin or R77A→A mutant. (Two molecules).                          | FPR moiety.                                                                                                  | Extensive contacts with either second monomer or symmetry-related molecule; Tyr <sup>76</sup> sits in a cage formed by side chains of Tyr <sup>14J</sup> , Pro <sup>204</sup> and Phe <sup>204A</sup> ; additional contacts to a second, symmetry-related molecule. | <sup>67</sup> |

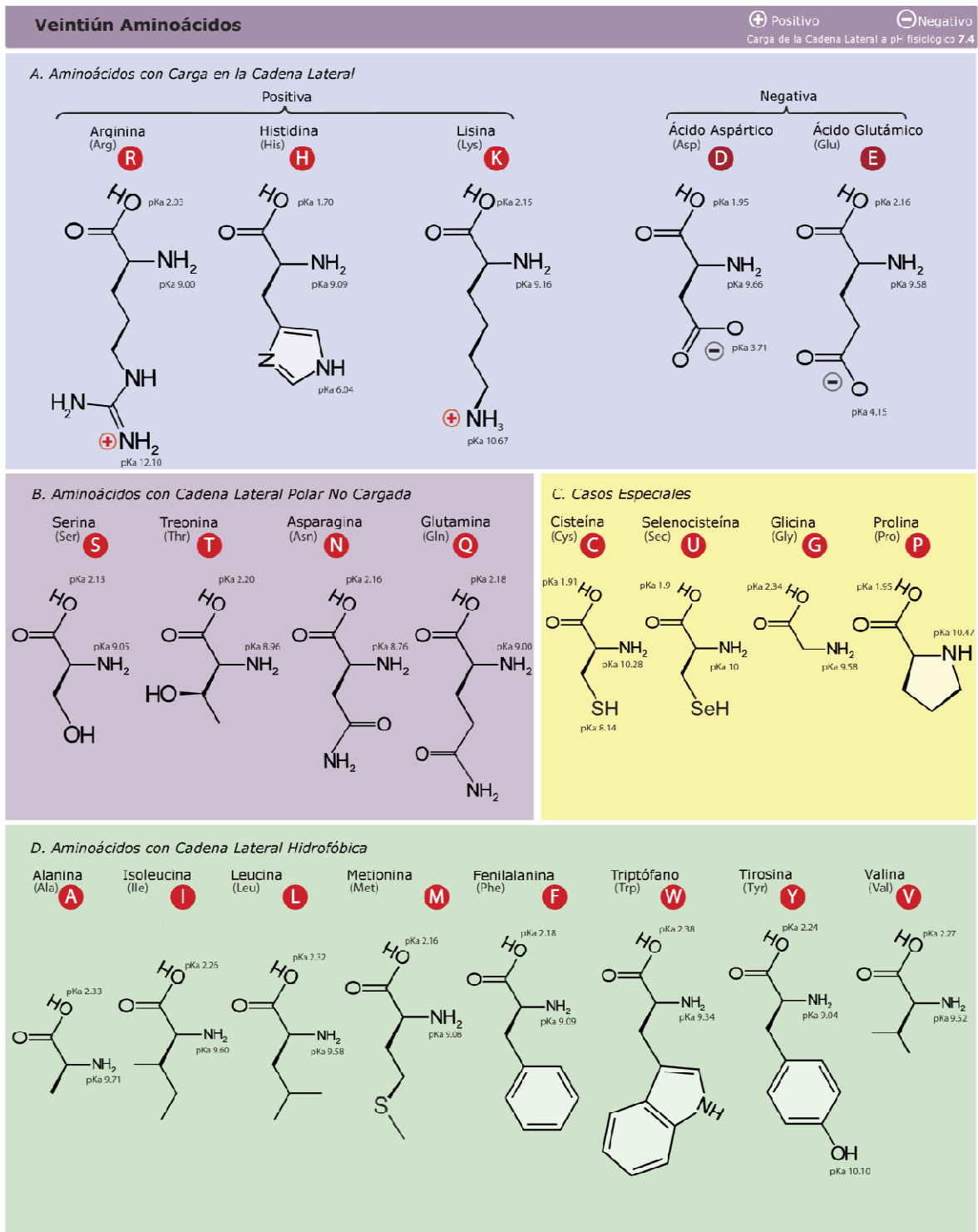
| Orthorhombic (P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> )<br>a = 65.60 Å, b = 102.80 Å, c = 119.70 Å |                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1AWH/ 3.00                                                                                               | Human thrombin bound to 5,5- <i>trans</i> -fused cyclic lactone euphane triterpene GR133686. (Two complex molecules).                                                          | Trans-lactone inhibitor covalently bound to Ser <sup>195</sup> O <sub>γ</sub> .                                                 | AB: Contacts symmetry-related dimer (exosite I; α-helix 165–171).<br><br>CD: Contacts symmetry-related molecule (exosite I, Ile <sup>24</sup> ).                                                                               | 14 |
| Orthorhombic (P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> )<br>a = 90.04 Å, b = 90.70 Å, c = 159.90 Å  |                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                |    |
| 1SR5/ 3.10                                                                                               | Ternary complex of antithrombin-anhydrothrombin-synthetic 16-mer heparin mimetic (SR123781A). (One complex molecule).                                                          | Reactive center loop of antithrombin (residues Ile <sup>422</sup> -Asp <sup>428</sup> ; position P4 to P3').                    | Contacts with heparin molecules from a symmetric a symmetry-related molecule.                                                                                                                                                  | 68 |
| Orthorhombic (C222 <sub>1</sub> )<br>a = 92.15 Å, b = 80.01 Å, c = 100.60 Å                              |                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                |    |
| 1TWX/ 2.40                                                                                               | Human thrombin double mutant D221A, D222K, bound to Hir(55-64) (SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ). (One complex molecule).                                                        | Free.                                                                                                                           | Hirudin residues Asp <sup>55</sup> -Leu <sup>64</sup> ; additional contacts with exosite I residues from a symmetry-related molecule.                                                                                          | 69 |
| Tetragonal (P4 <sub>3</sub> )<br>a = b = 50.90 Å, c = 325.80 Å                                           |                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                |    |
| 1HLT/ 3.00                                                                                               | Human thrombin bound to Glu <sup>408</sup> -Glu <sup>426</sup> peptide from thrombomodulin EGF domain 5. (Two complex molecules).                                              | FPR moiety.                                                                                                                     | Thrombomodulin peptide sandwiched between exosite I regions of the two independent thrombin molecules. <sup>5</sup>                                                                                                            | 70 |
| Tetragonal (P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2)<br>a = b = 90.34 - 90.80 Å, c = 132.34 - 132.50 Å          |                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                |    |
| 1FPH <sup>c</sup> / 2.50                                                                                 | Human thrombin bound to Hir(54-65) or [des-amino Asp55]hirudin(55-65) and either CMK derivative of fibrinopeptide A or active site-directed inhibitor. (One complex molecule). | Fibrinopeptide A or small synthetic inhibitor.                                                                                  | Hirudin residues Asp <sup>55</sup> -Gln <sup>65</sup> ; additional contacts with exosite I and bound hirudin peptide from a symmetry-related complex molecule.                                                                 | 71 |
| Hexagonal (P3 <sub>1</sub> )<br>a = b = 76.26 Å, c = 192.45 Å                                            |                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                |    |
| 2A45/ 3.65                                                                                               | FPR-inhibited thrombin bound to central fibrinogen fragment E. (Two thrombin molecules bound to covalent α <sub>2</sub> β <sub>2</sub> γ <sub>2</sub> Fbg dimer).              | FPR moiety covalently linked to Ser <sup>195</sup> O <sub>γ</sub> and His <sup>57</sup> Nε2.                                    | Fbg residues from all three chains: Phe <sup>35</sup> , Asp <sup>38</sup> , Glu <sup>39</sup> (α), Ala <sup>68</sup> , Asp <sup>69</sup> (β), Asp <sup>27</sup> , Ser <sup>30</sup> (γ).                                       | 72 |
| Hexagonal (P6 <sub>1</sub> )<br>a = b = 152.31 Å, c = 126.80 Å                                           |                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                |    |
| 1JMO/ 2.20                                                                                               | Human thrombin Ser195Ala mutant bound to heparin cofactor II. (One complex molecule).                                                                                          | Serpin reactive site loop, residues Phe <sup>441</sup> -Thr <sup>446</sup> ; Leu <sup>444</sup> occupies S <sub>1</sub> pocket. | Serpin peptide Leu <sup>61</sup> -Phe <sup>67</sup> ; also contacts α-helix Arg <sup>126</sup> -Leu <sup>129c</sup> and following residues (Glu <sup>127</sup> , Gln <sup>131</sup> ) of a symmetry-related thrombin molecule. | 73 |

| Hexagonal (P6 <sub>5</sub> )<br>a = b = 93.10 Å, c = 95.29 Å    |                                                                                                                                                   |                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                  |    |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1C4Y/ 2.70                                                      | Human thrombin bound to Hir(52-64) (SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) and synthetic inhibitor. (One complex molecule).                               | Synthetic inhibitor; cyclohexyl moiety in S <sub>1</sub> pocket.                                               | Hirudin residues Asp <sup>55</sup> –Leu <sup>64</sup> ; contacts also residues from α-helix Arg <sup>126</sup> –Leu <sup>129C</sup> (Arg <sup>126</sup> , Glu <sup>127</sup> ).                  | 15 |
| Hexagonal (P6 <sub>122</sub> )<br>a = b = 81.68 Å, c = 186.40 Å |                                                                                                                                                   |                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                  |    |
| 1UVS/ 2.80                                                      | Bovine thrombin bound to synthetic inhibitor, BM51.1011. (One complex molecule).                                                                  | Non-primed subsites S <sub>4</sub> –S <sub>1</sub> occupied by synthetic inhibitor.                            | Apical residues make important contacts with a symmetry-related molecule (70-80 loop, intermediate helix). Disordered or partially disordered residues Thr <sup>74</sup> and Arg <sup>75</sup> . | 16 |
| Hexagonal (H3)<br>a = b = 214.40 Å, c = 131.41 Å                |                                                                                                                                                   |                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                  |    |
| 1DX5/ 2.30                                                      | Human α-thrombin, irreversibly inhibited with Glu-Gly-Arg chloromethyl ketone, bound to active thrombomodulin fragment. (Four complex molecules). | Glu-Gly-Arg tripeptide, covalently linked to His <sup>57</sup> Nε2 and Ser <sup>195</sup> Oγ.                  | Thrombomodulin, EGF domains 5 and 6.                                                                                                                                                             | 17 |
| Cubic (P2 <sub>1</sub> 3)<br>a = b = c = 131.93 Å               |                                                                                                                                                   |                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                  |    |
| 1TQ0/ 2.80                                                      | Human thrombin W215A/E217A double mutant. (Two thrombin molecules).                                                                               | Essentially free.                                                                                              | Extensive contacts with both light and heavy chain residues from symmetry related molecule, including exosite I residues.                                                                        | 18 |
| Cubic (I2 <sub>1</sub> 3)<br>a = b = c = 135.10 Å               |                                                                                                                                                   |                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                  |    |
| 1DM4/ 2.50                                                      | Human thrombin Ser195Ala mutant bound to fibrinopeptide A residues Asp <sup>7</sup> –Arg <sup>16</sup> . (One complex molecule).                  | Fibrinopeptide A; non-primed sites occupied by substrate residues, Arg <sup>16</sup> in S <sub>1</sub> pocket. | Extensive contacts with both light and heavy chain residues (exosite I) from a symmetry-related molecule.                                                                                        | 19 |





## Anexo 2: Estructura y clasificación de los aminoácidos

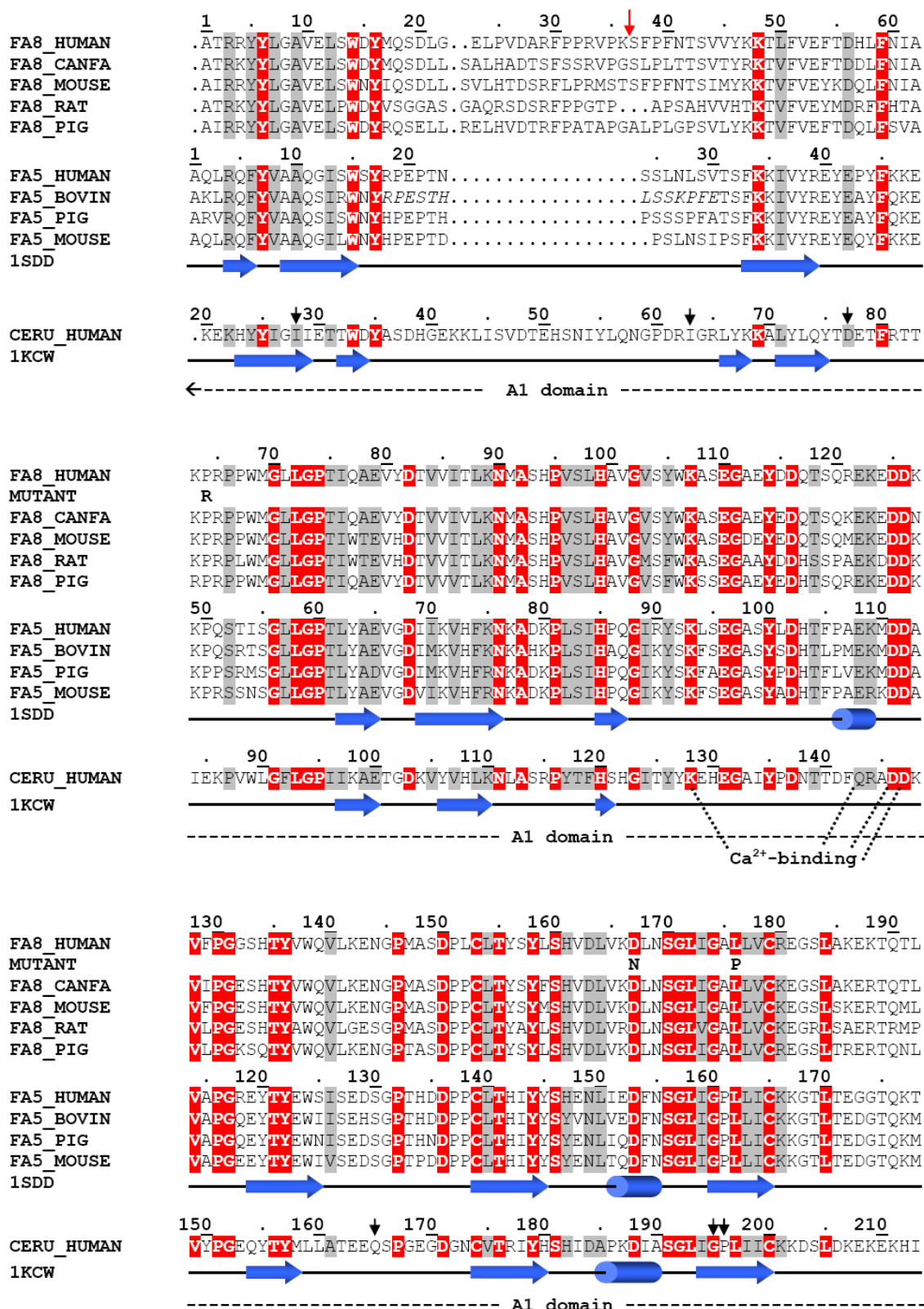


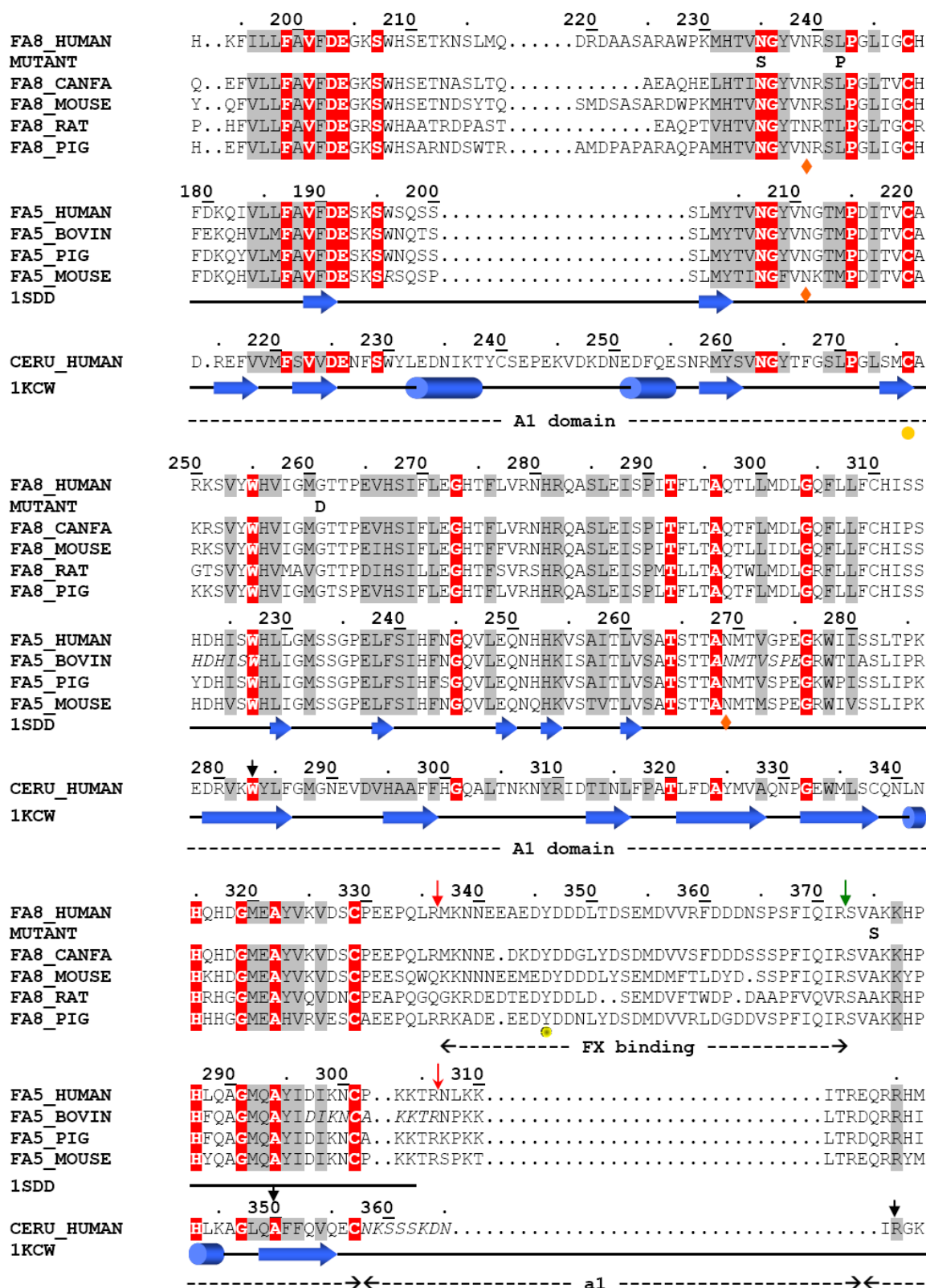


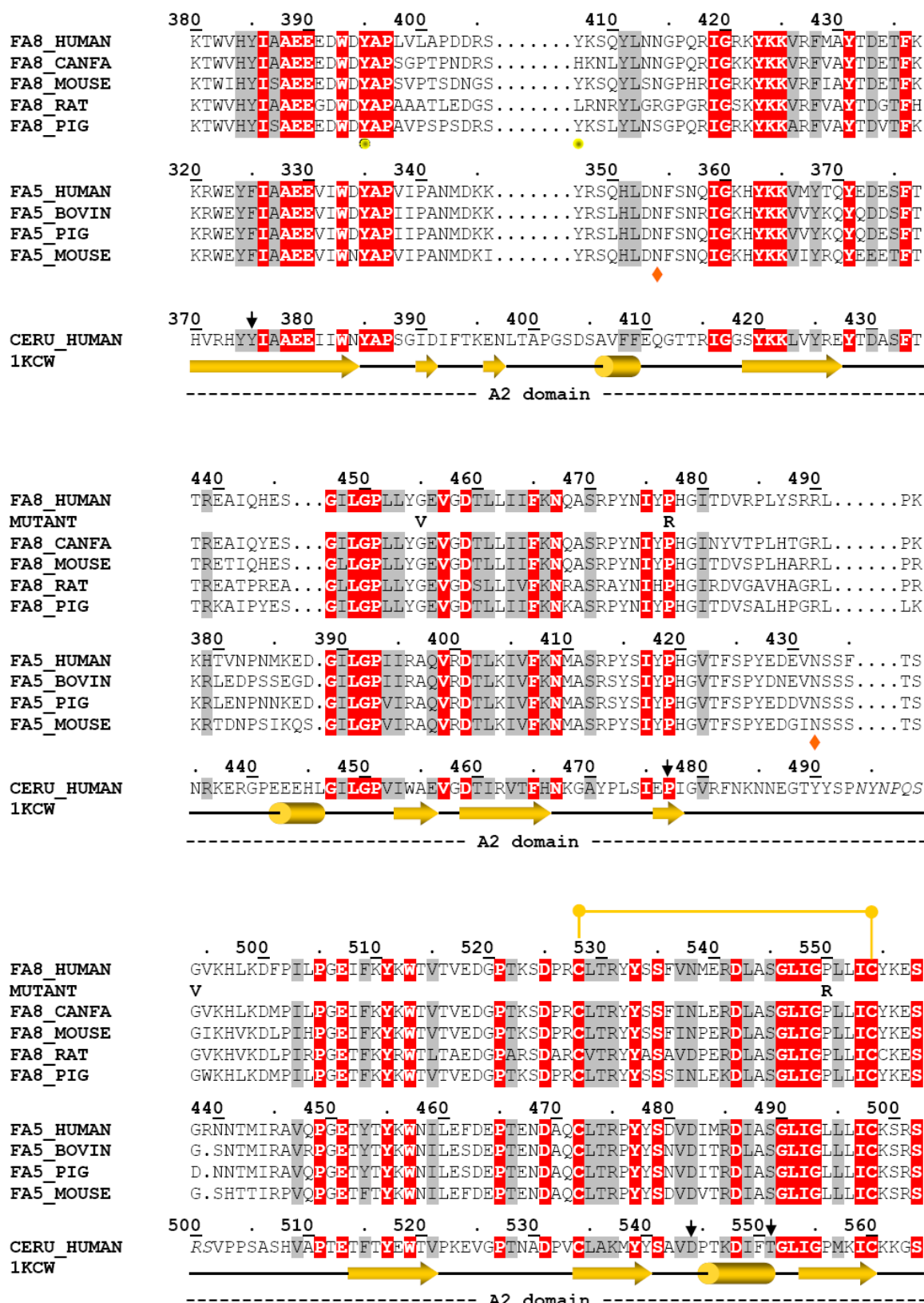
### Anexo 3: Alineamientos de las secuencias de los Factores V y VIII

#### Leyenda:

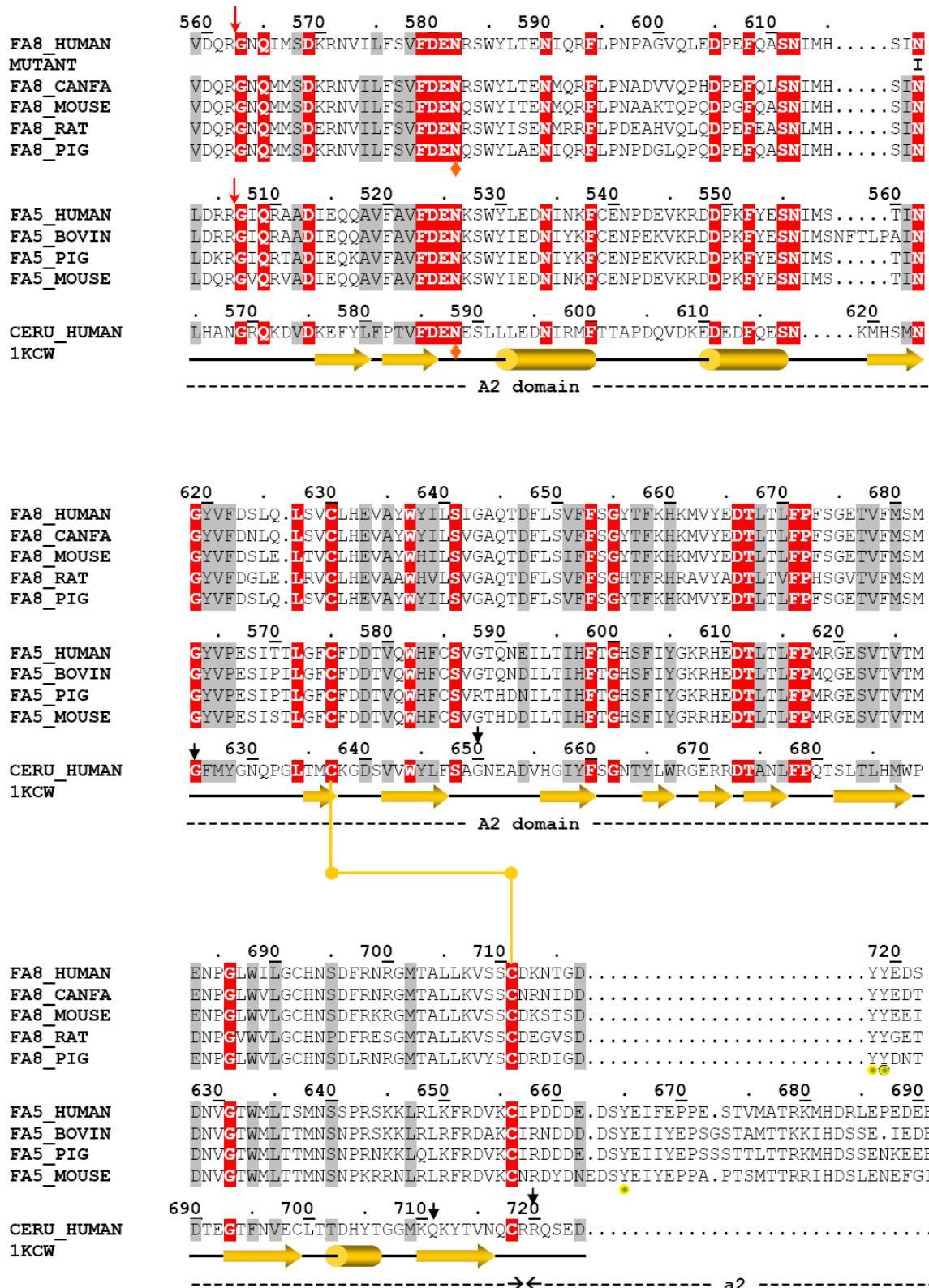
- Los **residuos estrictamente conservados** se muestran en blanco con sombreado rojo; las substituciones conservativas se muestran en gris.
- La **numeración** sobre los alineamientos corresponde a los cofactores humanos maduros.
- **1SDD** corresponde al código del PDB de la estructura cristalográfica del **FVa inactivado humano** (Adams *et al.*, PNAS 2004); **1KCW** a la **ceruloplasmina humana** (Zaitseva *et al.*, J. Biol. Inorg. Chem.1996); **1D7P** al **dominio C2 del FVIII humano** (Pratt *et al.*, Nature 1999) y **1CZT** al **dominio C2 del FV humano** (Macedo-Ribeiro *et al.*, Nature 1999).
- Los **cortes proteolíticos** llevados a cabo por las enzimas siguientes se indican mediante:
  - ↓ Trombina (activación).
  - ↓ Plasmina (inactivación; Nogami *et al.*, JBC 2007).
  - ↓ aPC (inactivación).
- Las siguientes **modificaciones post-translacionales** se indican con los símbolos:
  - Tirosina sulfatada. (Destacar que aquellas en las posiciones 395 y 407 en el FVIII no han sido verificadas experimentalmente. En el FV, ninguno de estos sitios ha sido verificado).
  - ◆ Sitios de *N*-glicosidación. (Únicamente se indican los sitios conservados).
- Los residuos Ser-97–Tyr-105 del dominio A1 del FVIII representan un sitio interactivo de la cadena ligera (Ansong *et al.*, Biochemistry 2006).
- El residuo Glu1829 del dominio A3, contribuye a la unión de la subunidad A2 en el FVIIIa (Wakabayashi *et al.*, J. Thromb. Haemost. 2007).
- Los residuos del dominio A3 His-1954–His-1961 están implicados en interacciones con el dominio A1 (Ansong & Fay, Biochemistry 2005).
- Las regiones involucradas en la unión a membrana se muestran **recuadradas**.



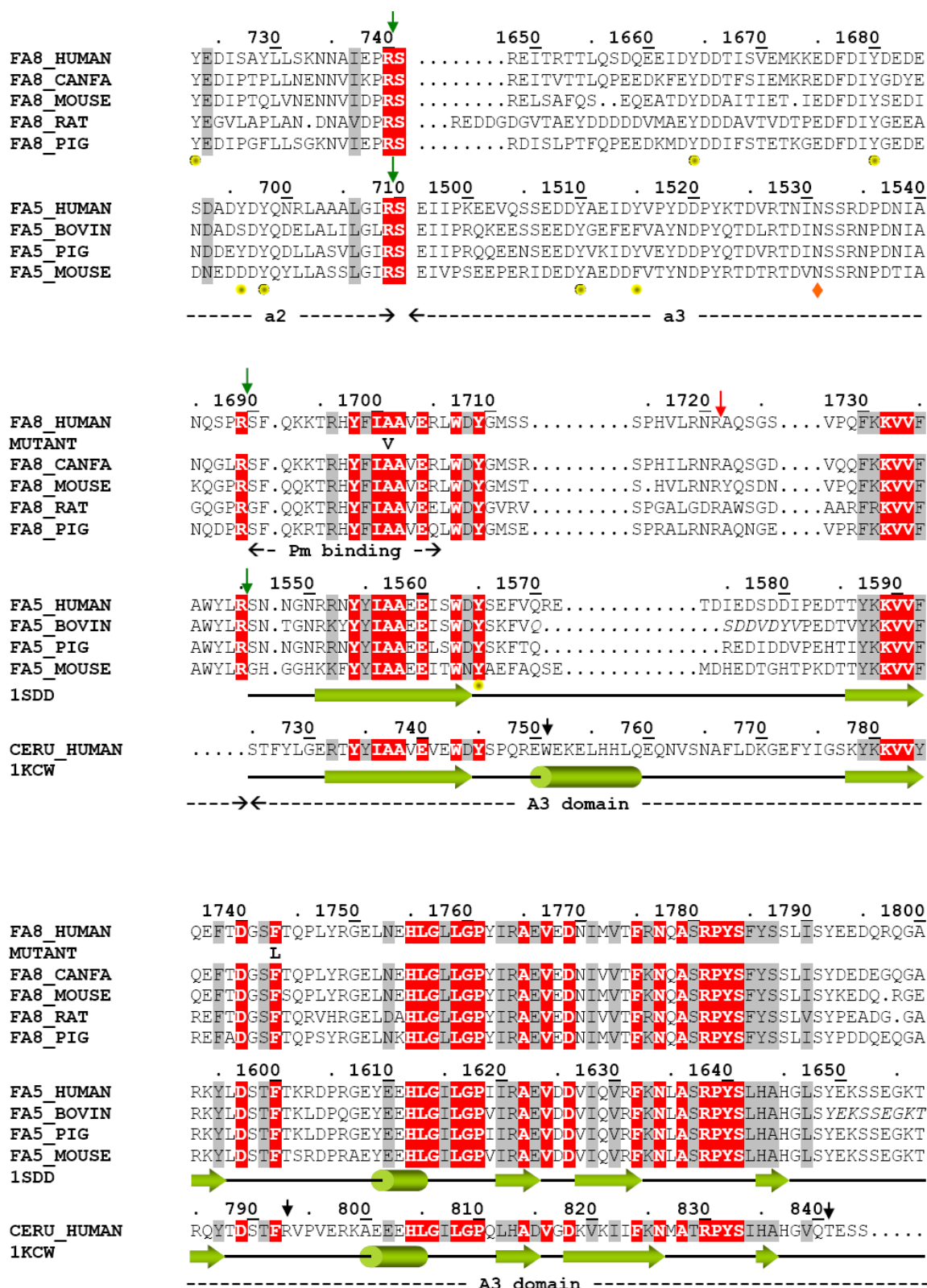


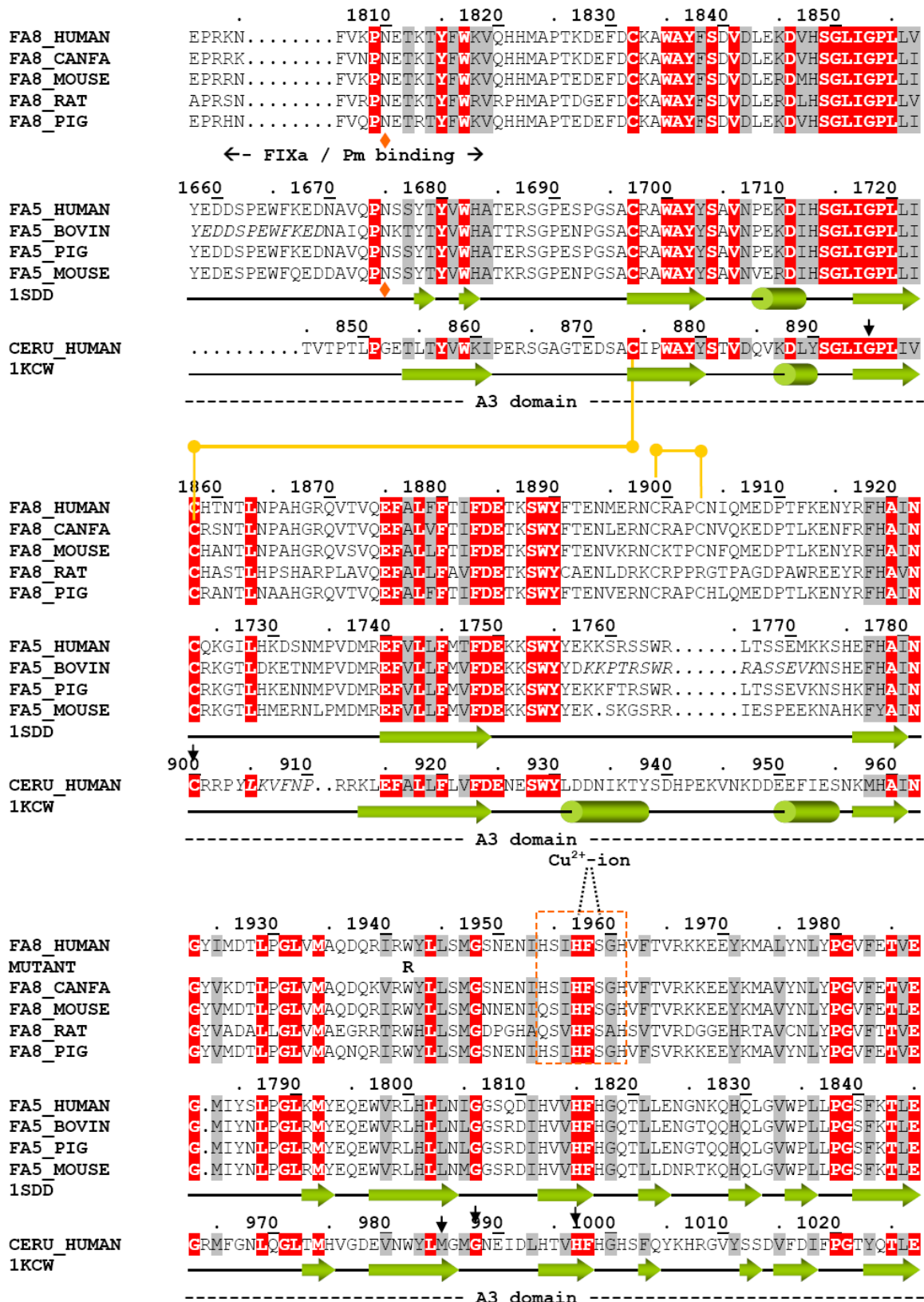


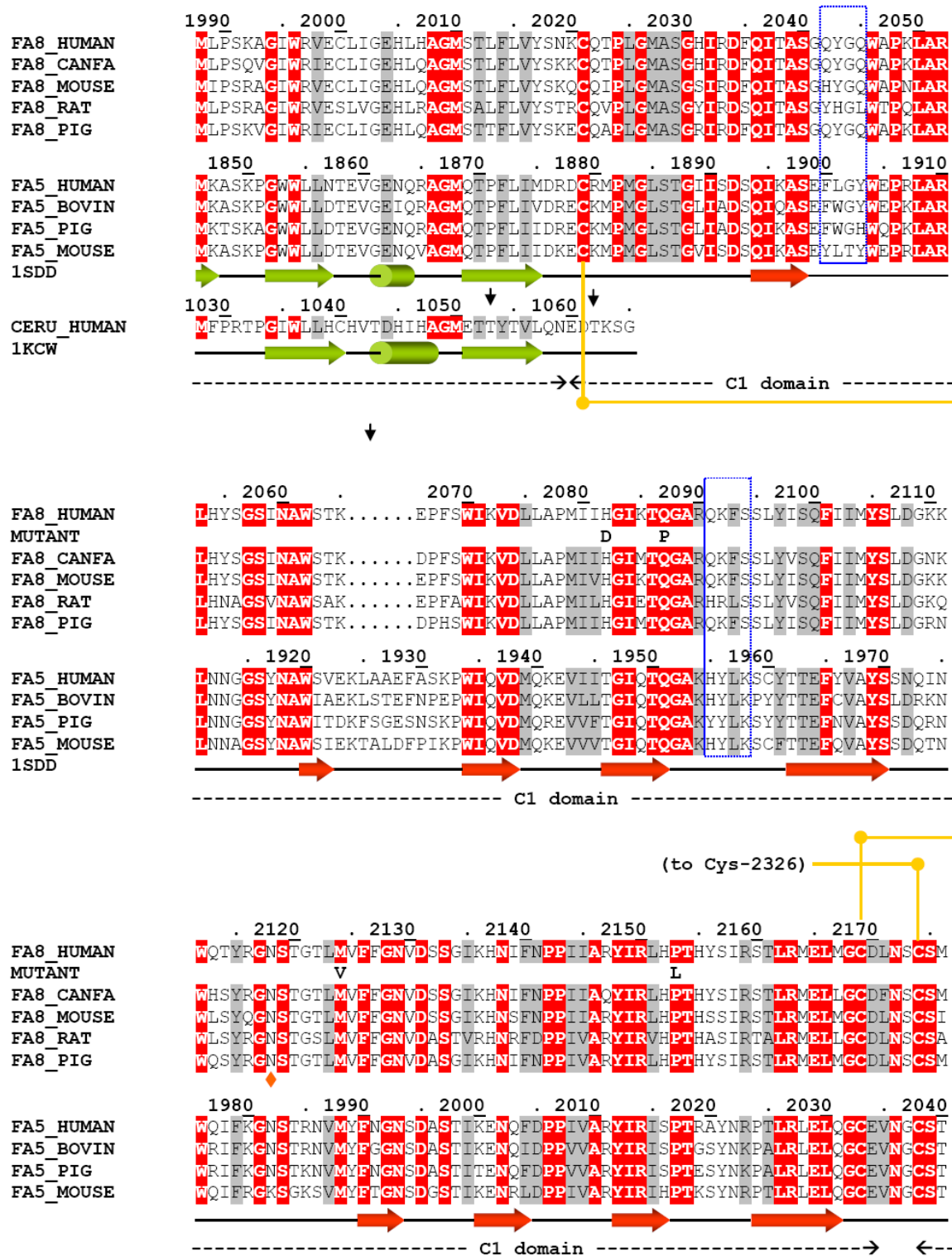


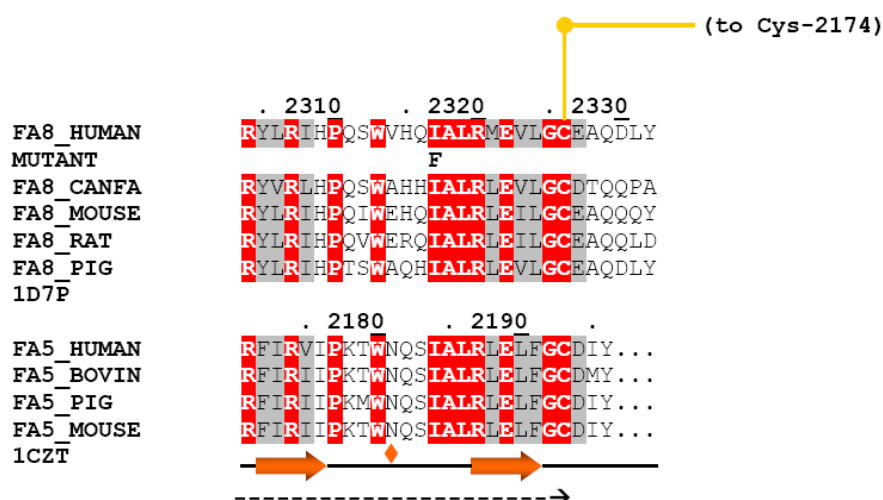
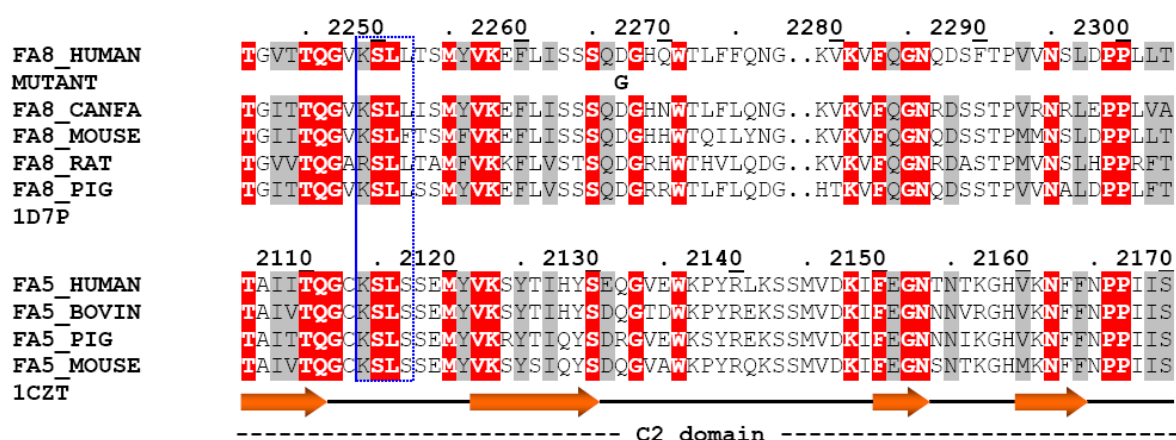
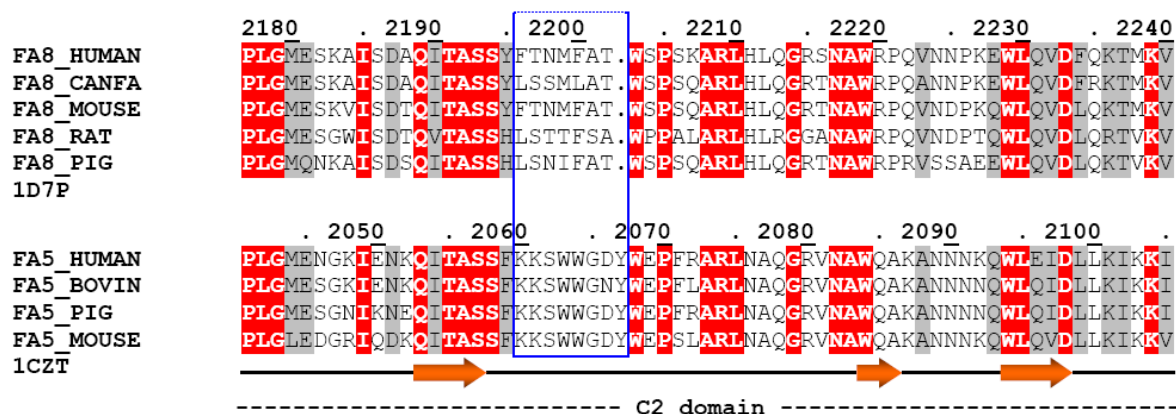












Alineamiento de Fuentes-Prior, P. (sin publicar)





## Anexo 4: Mapa del vector de clonación

Modificado de la página web de Novagen (<http://www.merckmillipore.es>)

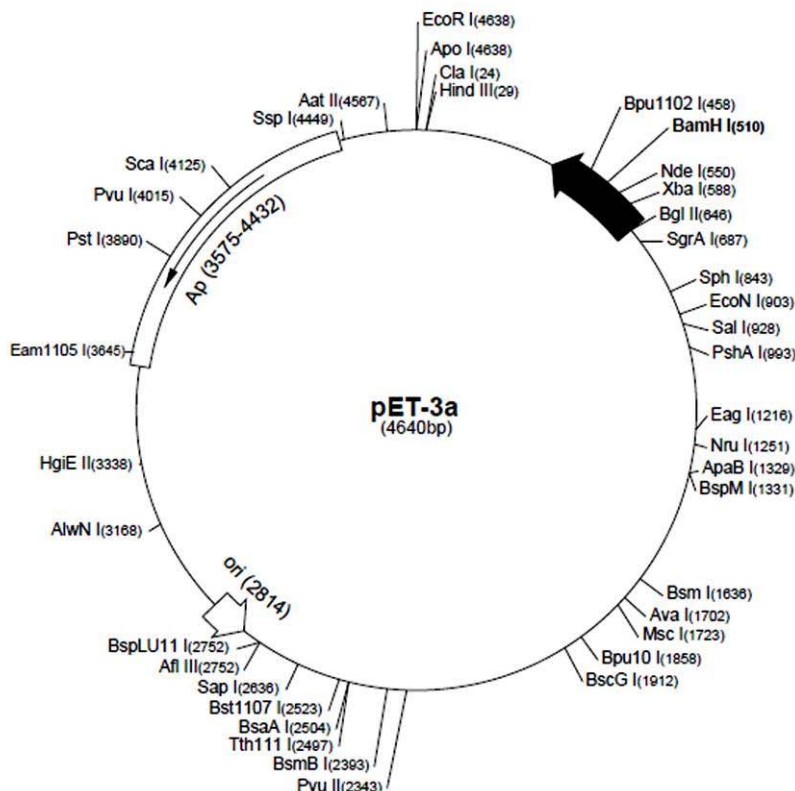
### pET-3a-d Vectors

The pET-3a-d vectors carry an N-terminal T7•Tag® sequence and *Bam*H I cloning site. These vectors are the precursors to many pET family vectors; the pET-23a-d(+) series corresponds to pET-3a-d but incorporates several additional features. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below.

#### pET-3a sequence landmarks

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| T7 promoter                | 615-631   |
| T7 transcription start     | 614       |
| T7•Tag coding sequence     | 519-551   |
| T7 terminator              | 404-450   |
| pBR322 origin              | 2814      |
| <i>bla</i> coding sequence | 3575-4432 |

The maps for pET-3b, pET-3c and pET-3d are the same as pET-3a (shown) with the following exceptions: pET-3b is a 4639bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 510. pET-3c is a 4638bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 510. pET-3d is a 4637bp plasmid; the *Bam*H I site is in the same reading frame as in pET-3c. An *Nco* I site is substituted for the *Nde* I site with a net 1bp deletion at position 550 of pET-3c. As a result, *Nco* I cuts pET-3d at 546. For the rest of the sites, subtract 3bp from each site beyond position 551 in pET-3a. *Nde* I does not cut pET-3d.



|                                                                                                                    |             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| T7 promoter primer #69348-3                                                                                        |             |
| <i>Bgl</i> II                                                                                                      | T7 promoter |
| AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACCTTAAGAAGGAGA                         |             |
| <i>Nde</i> I                                                                                                       | T7•Tag      |
| TATACATATGGCTAGCATGACTGGTGACAGCAATGGGTCGCGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAA |             |
| MetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGlnMetGlyArgGlySerGlyCysEnd                                                                |             |
| <i>Bam</i> HI                                                                                                      |             |
| T7 terminator primer #69337-3                                                                                      |             |
| <i>Bpu</i> 1102 I                                                                                                  |             |
| T7 terminator                                                                                                      |             |
| CCCTTGGGCGCTCAAACGGGCTTGAGGGGTTTTTG                                                                                |             |

#### pET-3a-d cloning/expression region



## Anexo 5: Tampones y disoluciones

### 1. MEDIOS DE CULTIVO

**Medio LB:** 1% (p/v) Triptona, 0.5% Extracto de levadura, 1% NaCl (85.6 mM), pH 7.0

**Medio SOB (del inglés, *Super optimal broth*):** 2% (p/v) Triptona, 0.5% (p/v) extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>.

**Medio SOC (del inglés, *Super optimal broth with Catabolite repression*):** medio SOB + 20 mM glucosa.

**LB/Agar:** Medio LB + 1.5% (p/v) agar.

**Medio mínimo M9:** Todas las soluciones deben estar filtradas/estériles. Para el marcaje de proteínas recombinantes con <sup>15</sup>N y <sup>13</sup>C, se emplea <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl y <sup>13</sup>C-glucosa.

**Para preparar 1 litro de medio mínimo M9 se adiciona:**

20 ml de 10% (p/v) Glucosa; 1 ml de 1M MgSO<sub>4</sub>; 0.3 ml de 1M CaCl<sub>2</sub>; 1 ml de 1 mg/ml Biotina; 1 ml de 1 mg/ml Tiamina; 100 ml solución de sales M9 (1X); 10 ml de solución de elementos traza.

Llevar a 1 litro con y adicionar los antibióticos correspondientes.

**Solución de sales M9 (10X):**

60g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 30 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5 g NaCl; 5 g NH<sub>4</sub>Cl

Llevar a 1 litro con agua bidestilada estéril, autoclavar y almacenar a 4 °C.

**Solución de elementos traza (100X):**

Disolver 5 g de Na<sub>2</sub>EDTA en 800 ml de agua bidestilada estéril, ajustar el pH a 7.5

Adicionar en este orden: 0.83 g de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0.084 g de ZnCl<sub>2</sub>; 0.013 g de CuCl<sub>2</sub>; 0.01 g de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0.01 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 1.6 mg de MnCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

Llevar a 1 litro con agua bidestilada estéril, autoclavar y almacenar a 4°C.

### 2. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS RECOMBINANTES

**Cromatografía por afinidad:**

**Tampón de equilibrado (*batch*):** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8.0

**Tampón de lavado (*batch*):** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 30 mM Imidazol, pH 8.0

**Tampón de elución (*batch*):** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 100-500 mM Imidazol, pH 8.0

**Tampón de equilibrado (FPLC):** 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8.0

**Tampón de elución (FPLC):** 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 50-500 mM Imidazol, pH 8.0



### 3. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

#### *Geles Tris-tricina en condiciones desnaturalizantes*

**Disolución para el gel separador de 12% de acrilamida:** 12% (v/v) acrilamida/bis, 1 M Tris, pH 8.45, 0.1% (p/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, 0.15% (p/v) persulfato amónico, 0.047% (v/v) TEMED.

**Disolución para el gel apilador:** 15% (v/v) acrilamida/bis, 15% tampón Tris/SDS, 0.06% (p/v) persulfato amónico, 0.12% (v/v) TEMED (Bio-Rad).

**Tampón de tratamiento de muestra sin reductor:** 50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 2% (p/v) SDS, 10% glicerol (v/v), 0.1% azul de bromofenol

**Tampón de tratamiento de muestra con reductor:** 50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 2% (p/v) SDS, 10% glicerol (v/v), 200 mM DTT, 0.1% azul de bromofenol

**Tampón para cátodo:** 0.1 M Tris, 0.1 M tricina, 0.1% (p/v) SDS

**Tampón para ánodo:** 0.2 M Tris-Cl, pH 8.9

#### *Geles Tris-glicina en condiciones desnaturalizantes*

**Tampón I:** 1.5 M Tris, 0.4% (p/v) SDS, pH 8.8

**Tampón II:** 1 M Tris, 0.4% (p/v) SDS, pH 7.0

**Disolución para el gel separador de 12% de acrilamida:** 40 % (v/v) acrilamida/bis, 0.5 M Tris, pH 8.8, 0.1% (p/v) SDS, 0.015% (p/v) persulfato amónico, 0.055% (v/v) TEMED.

**Disolución para el gel apilador:** 3 % acrilamida/bis, 0.25 M Tris, 0.08 % (p/v), 0.02% (p/v) persulfato amónico, 0.12% (v/v) TEMED (Bio-Rad).

**Tampón de tratamiento de muestra sin reductor:** 50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 2% (p/v) SDS, 10% glicerol (v/v), 0.1% azul de bromofenol

**Tampón de tratamiento de muestra con reductor:** 50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 2% (p/v) SDS, 10% glicerol (v/v), 200 mM DTT, 0.1% azul de bromofenol

**Tampón de recorrido:** 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% (p/v) SDS

#### *Geles Tris-glicina en condiciones nativas*

La composición de los geles y las disoluciones empleadas es la misma que en el caso anterior, pero eliminando el contenido de SDS en todas ellas.

**Geles HEPES/imidazol en condiciones nativas**

**Composición del gel separador:** 12% acrilamida/bisacrilamida, 43 mM imidazol, 35 mM HEPES, pH 7.4, 0.05% persulfato amónico, 0.15% Temed.

**Composición del gel apilador:** 4% acrilamida/bis, 43 mM imidazol, 35 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% persulfato amónico, 0.2% Temed

**Composición del tampón de recorrido:** 43 mM imidazol, 35 mM HEPES, pH 7.4

**4. TINCIÓN DE GELES*****Tinción con azul Coomassie***

**Disolución de tinción con azul de Coomassie:** 10% (v/v) ácido acético, 50% (v/v) metanol, 0.25% (p/v) azul de Coomassie.

**Disolución de desteñido I:** 10% (v/v) ácido acético, 50% (v/v) metanol.

**Disolución de desteñido II:** 10% (v/v) ácido acético, 7% (v/v) metanol.

***Tinción con plata***

**Disolución fijadora:** 30% (v/v) etanol, 10% (v/v) ácido acético

**Disolución de revelado:** 6% (p/v) carbonato de sodio, 0,05% (v/v) formaldehído, 0,0004% (p/v) tiosulfato de sodio)

**5. WESTERN BLOT**

**Tampón de transferencia para Western blot:** (0.05 M Tris, 0.4 M glicina, 0.5% SDS, 20% metanol)

**TBS:** 10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.0

**6. TAMPONES Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN DE LAS ENZIMAS DE DIGESTIÓN UTILIZADAS*****Endoproteinasa Arg-C***

**Tampón de digestión:** 90 mM Tris-HCl, 8.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, pH 7.6

**Incubación:** 8h, a 37 °C

**Relación enzima sustrato:** 1:160

**Endoproteinasa Asp-N**

**Tampón de digestión:** 50 mM fosfato de sodio, pH 8.0

**Incubación:** 8h, a 37 °C

**Relación enzima sustrato:** 1:30

**Tripsina**

**Tampón de digestión:** 100 mM Tris-HCl, pH 8.5

**Incubación:** 8h, a 37 °C

**Relación enzima sustrato:** 1:50

**Endoproteinasa Glu-C**

**Tampón de digestión:** 50 mM fosfato de sodio, pH 7.8

**Incubación:** 8h, a 25 °C

**Relación enzima sustrato:** 1:50

**7. TAMPONES UTILIZADOS EN ENSAYOS DE MICROCALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC), TERMOFLUORESCENCIA Y RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR****Microcalorimetría diferencial de barrido (DSC):**

25 mM PIPES, pH 6.5, 150 mM NaCl

**Termofluorescencia:**

50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl

**Resonancia magnética nuclear (RMN) de proteínas:**

25 mM de fosfato de sodio, pH 6.0, 25 mM NaCl, 500 µM EDTA, 5 mM de TCEP

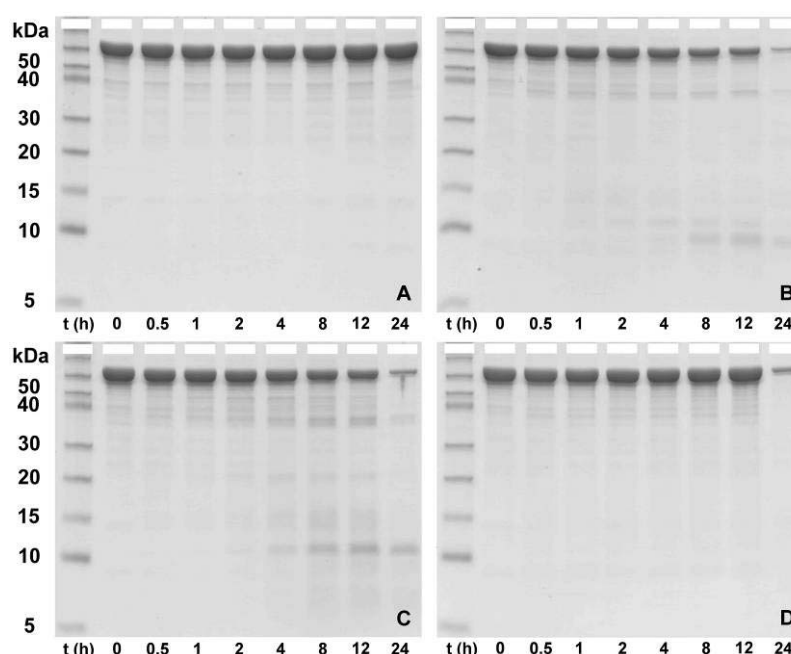
**Anexo 6: Formulación de soluciones de cristalización del kit *Thrombin Screen***

1. 0.3 M Fosfato sódico pH 6.0, 10% PEG 4K
2. 0.1 M Na-Hepes pH 7.5, 0.2 M formato de magnesio, 12% PEG 4K
3. 0.05 M Acetato de sódio pH 4.6, 0.1 M sulfato de amonio, 16% PEG 4K
4. 0.1 M Na-Hepes pH 7.0, 2.0 M sulfato de amonio, 2% PEG 400
5. 0.1 M Fosfato de sodio pH 7.5, 25% PEG 8K
6. 0.1 M Acetato de sodio pH 4.6, 0.2 M  $MgCl_2$ , 28% PEG 4K
7. 0.2 M Fosfato de sodio pH 7.0, 14% PEG 6K
8. 0.2 M Fosfato de sodio pH 6.0, 0.5 M NaCl, 20% PEG 6K
9. 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 26% PEG 8K
10. 0.1 M Na-Hepes pH 7.0, 20% PEG 8K
11. 0.05 M fosfato de potasio, 18% PEG 8K
12. 0.1 M Citrato sódico pH 5.5, 16% 2-propanol, 16% PEG 4K
13. 0.1 M MES pH 6.5, 0.01 M  $CaCl_2$ , 18% PEG 6K
14. 0.05 M Acetato de sodio pH 4.6, 0.1 M acetato de amonio, 0.2 M sulfato de amonio, 25% PEG 4K
15. 0.1 M Na-Hepes pH 7.0, 20% etanol
16. 0.05 M MES-NaOH pH 6.0, 1.6 M sulfato de amonio
17. 0.1 M Citrato de sodio pH 5.5, 2% PEG 10K, 20% 2-propanol
18. 0.1 M MES pH 6.5, 0.3 M acetato de sodio, 6% PEG 4K
19. 0.1 M Acetato de sodio pH 4.6, 0.2 M acetato de amonio, 15% PEG 4K
20. 0.1 M Citrato de sódio pH 5.5, 0.2 M acetato de amonio, 20% PEG 4K
21. 0.1 M Na-Hepes pH 7.0, 0.2 M sulfato de amonio, 2.0 M fosfato de sodio y de potasio
22. 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 1.6 M sulfato de amonio
23. 0.1 M Na-Hepes pH 7.5, 20% 2-propanol
24. 0.1 M Citrato de sodio pH 5.5, 22% PEG 6K



## Anexo 7: Digestión de albúmina de suero bovino con endoproteinasa Arg-C

Los ensayos de digestión de la albúmina de suero bovino (BSA) mediante endoproteinasa Arg-C evidenciaron que tanto la BSA (**B**) como la BSA en presencia de 10 mM de benzamidina (**C**) son proteolizadas, generando cambios en los patrones de digestión detectados, particularmente, a partir de las 4 h de incubación. La adición de 20 mM de EDTA a la reacción de digestión evidenció la inhibición de la endoproteinasa Arg-C (**D**). Estos ensayos, complementarios a los realizados con trombina libre y en presencia de ligandos del sitio activo de la proteinasa (epígrafe 4.1.1) comprueban que la benzamidina no inhibe a la Arg-C.

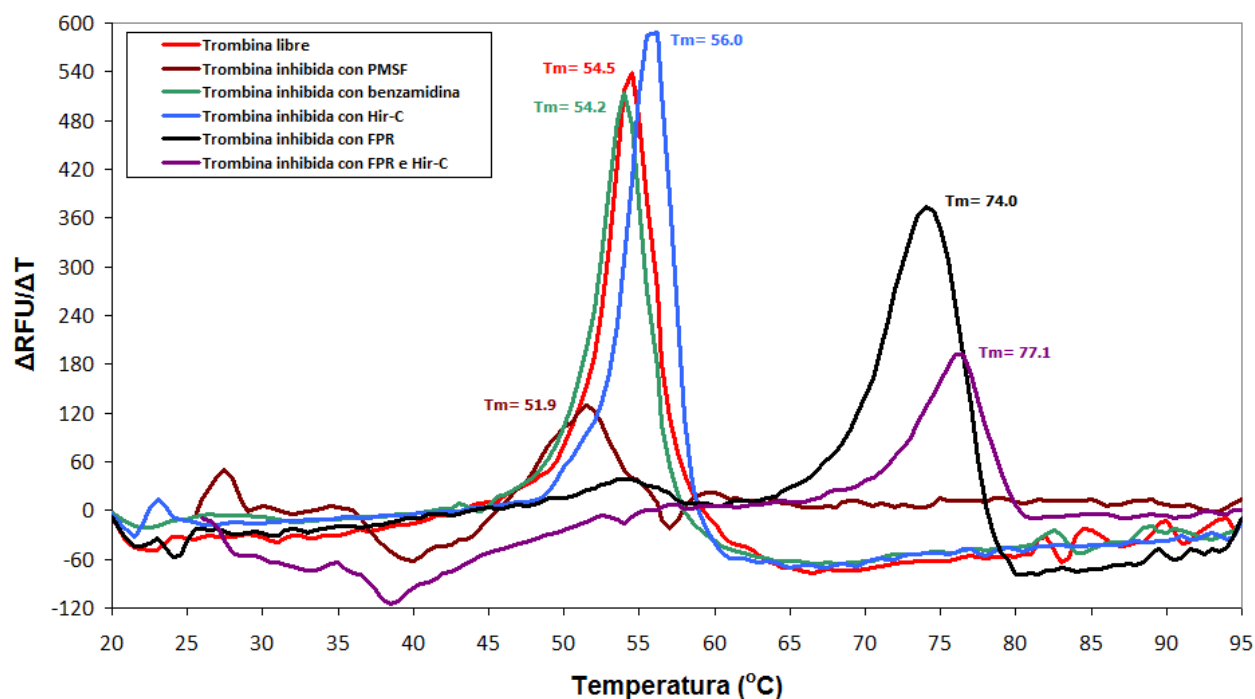


**Figura A.7 Digestión de BSA en presencia de la endoproteinasa Arg-C.** Aproximadamente 80  $\mu\text{g}$  de proteína fueron digeridas con 0.5  $\mu\text{g}$  de la endoproteinasa Arg-C (en una relación enzima:proteína de 1:160) en un volumen final de 140  $\mu\text{l}$  en 90 mM Tris-HCl, 8.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, pH 7.6. Las alícuotas se trataron exactamente como las de trombina según se indica en Materiales y Métodos (epígrafe 3.2.1), fueron tomadas en los tiempos indicados, analizadas por SDS-PAGE y a tinción con azul de Coomassie (ver Materiales y Métodos). BSA control (**panel A**), BSA en presencia de Arg-C (**B**), BSA en presencia de Arg-C y 10 mM de benzamidina (**C**) y, finalmente, adicionando a la mezcla de reacción 20 mM de EDTA, permitieron evidenciar que la benzamidina no inhibe a la endoproteinasa Arg-C (**D**).



## Anexo 8: Gráficas del efecto de diferentes ligandos sobre la estabilidad térmica de la trombina mediante termofluorescencia

Se presentan las gráficas de los ensayos de termofluorescencia diferencial de barrido (DSF) obtenidas para la trombina libre y en presencia de diferentes ligando dirigidos al sitio activo y al exosito I de la proteinasa. Los valores donde la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) es máxima se presentan en la tabla 4.2 del epígrafe de Resultados.



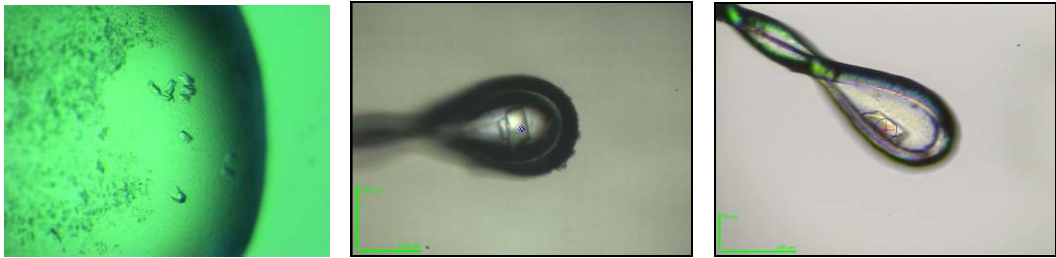
**Figura A.8 Análisis de la estabilidad térmica de la trombina mediante termofluorescencia diferencial.** Se evaluaron muestras de trombina libre y en presencia de diferentes ligandos a través de los cambios en los valores de la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ). Las muestras se prepararon a una concentración de 1  $\mu$ M y se dializaron exhaustivamente en 50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl. Los ensayos de termofluorescencia diferencial se realizaron con incrementos de temperatura de 0.5  $^{\circ}$ C, desde los 20 hasta los 95  $^{\circ}$ C, registrando el incremento en la fluorescencia a 545 nm del fluoróforo SYPRO Orange. Se grafica la primera derivada del cambio en las unidades relativas de fluorescencia con respecto a la temperatura (ver Materiales y Métodos). Nótese el incremento en la  $T_m$  de la trombina inhibida con Hir-C (celeste) o con FPR (negro), y el efecto sinérgico de ambos ligandos, evidenciado en la muestra de trombina incubada tanto con FPR como con Hir-C (morado).





### Anexo 9: Características de la obtención del complejo trombina·PAR1<sub>L</sub>(R42Q)

Condición de cristalización del kit *Structure Screen 1* en la que se obtuvo cristales del complejo trombina·PAR1<sub>L</sub>(R42Q). La disolución es parte del kit de cristalización de proteínas *Structure Screen 1* de Molecular Dimensions. Se presentan fotos del cristal del complejo en el sistema de gota colgante y en el *loop* una vez colectados. Las fotografías están tomadas a diferentes niveles de magnificación.

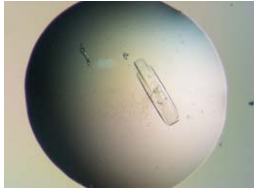
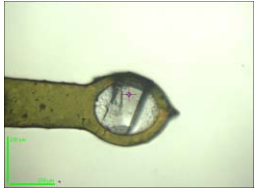
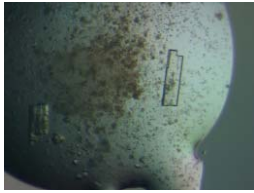
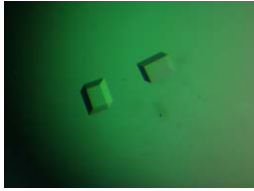
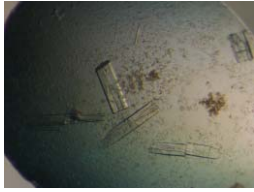
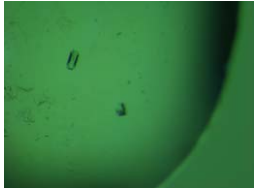
| Disolución de cristalización número 18 del kit<br><i>Structure Screen 1</i>         | Tiempo de aparición de cristales |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| 0.1 M cacodilato sódico, pH 6.5,<br>0.2 M acetato sódico,<br>30% (p/v) PEG 8K       | 5 días                           |
| Cristales del complejo obtenido                                                     |                                  |
|  |                                  |

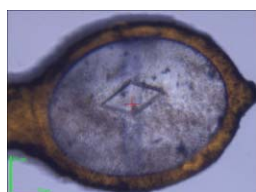


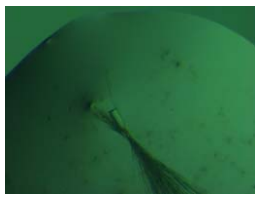
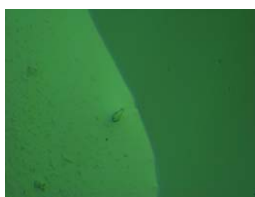
## Anexo 10: Listado de complejos de trombina-sustrato que se prepararon para los ensayos de cristalización

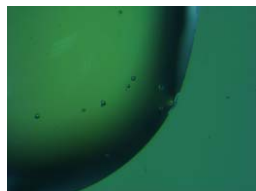
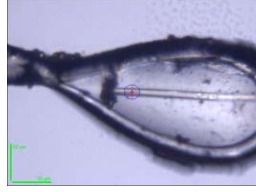
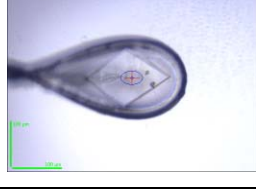
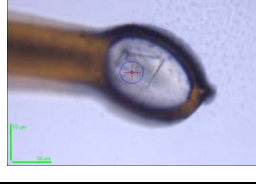
Para cada complejo putativo utilizado se indican las diferentes condiciones de cristalización en las que se obtuvieron cristales de calidad para resolver las estructuras tridimensionales. Se presenta también la resolución atómica, el grupo espacial, las dimensiones de la unidad asimétrica y una foto del cristal. Como se menciona en el epígrafe de resultados 4.2.4, los patrones de difracción de rayos X de estos cristales obtenidos se procesaron y las estructuras tridimensionales correspondientes fueron resueltas por reemplazamiento molecular, sin embargo, la inspección de los mapas de densidad electrónica sólo reveló densidad para la molécula de trombina y no así para el fragmento recombinante del sustrato respectivo.

| Descripción básica de los cristales de trombina obtenidos |                |                   |                                                               |                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------|----------------|-------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Condición de cristalización                               | Resolución (Å) | Grupo espacial    | Dimensiones de la celda unidad (Å)<br>a; b; c;<br>(α) (β) (γ) | Cristal                                                                               |
| Trombina incubada con exceso de FVIIIa1                   |                |                   |                                                               |                                                                                       |
| Morpheus 1-48                                             | 2.0            | P2 <sub>1</sub>   | 49.4; 73.8; 83.4<br>(90)(93.3)(90)                            | ---                                                                                   |
| Morpheus 1-13                                             | 3.0            | C222 <sub>1</sub> | 91.6; 98.2; 145.6<br>(90)(90)(90)                             |  |
| Morpheus 1-21                                             | 4.5            | P4                | 66.0; 66.0; 145.6<br>(90)(90)(90)                             |  |
| Morpheus 1-29                                             | 3.7            | C222 <sub>1</sub> | 91.7; 96.5; 145.3<br>(90)(90)(90)                             |  |
| Trombina-FPR incubada con exceso de FVIIIa1               |                |                   |                                                               |                                                                                       |

|                                                      |      |                                               |                                                                                      |                                                                                       |
|------------------------------------------------------|------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Pro-Plex 1-20                                        | 2.49 | P2 <sub>1</sub>                               | 66.5; 124.2; 75.5<br>(90)(93.8)(90)<br><br>*Estructura no descrita<br>previamente.   |    |
| Morpheus 1-8                                         | 1.9  | P2 <sub>1</sub>                               | 44.7; 73.8; 87.1<br>(90)(93.3)(90)                                                   | ---                                                                                   |
| Morpheus 1-4                                         | 1.7  | P2 <sub>1</sub>                               | 44.8; 74.3; 87.4<br>(90)(93.3)(90)                                                   | ---                                                                                   |
| Pro-Plex 1-18                                        | 2.45 | P2 <sub>1</sub>                               | 89.4; 77.5; 126.3<br>(90)(109.96)(90)<br><br>*Estructura no descrita<br>previamente. |    |
| Pro-Plex 1-11                                        | 1.9  | C2                                            | 69.0; 72.6; 69.7<br>(90)(98.8)(90)                                                   |    |
| Pro-Plex 1-37                                        | 1.75 | C2                                            | 70.1; 71.5; 72.1<br>(90)(99.8)(90)                                                   | ---                                                                                   |
| Pro-Plex 1-35                                        | 2.3  | C2                                            | 70.5; 71.8; 71.4<br>(90)(99.0)(90)                                                   |  |
| Hampton<br>Research 1-22                             | 1.7  | C2                                            | 69.5; 72.0; 69.8<br>(90)(97.7)(90)                                                   |  |
| Pro-Plex 1-47                                        | 1.7  | P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> | 45.2; 74.3; 90.9<br>(90)(90)(90)                                                     |  |
| <b>Trombina incubada con exceso de FVIIIa1 R372Q</b> |      |                                               |                                                                                      |                                                                                       |
| Morpheus 1-16                                        | 1.75 | P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> | 51.5; 77.6; 83.6<br>(90)(90)(90)                                                     |  |

|                                                                                             |      |                                               |                                                                                    |                                                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Morpheus 1-25                                                                               | 2.70 | C222 <sub>1</sub>                             | 90.6; 95.9; 145.5<br>(90)(90)(90)<br><br>*Estructura no descrita<br>previamente.   |    |
| Morpheus 2-25                                                                               | 2.70 | C222 <sub>1</sub>                             | 91.0; 98.0; 145.0<br>(90)(90)(90)                                                  |    |
| <b>Trombina incubada con exceso de FVIIIa1 R372Q, G373P</b>                                 |      |                                               |                                                                                    |                                                                                       |
| Morpheus 1-25                                                                               | 3.0  | C222 <sub>1</sub>                             | 91.3; 98.96; 145.85<br>(90)(90)(90)                                                |    |
| <b>Trombina incubada con exceso del péptido sintético del FVIIIa1 [EEPQLRMKNNEEAEDYDDD]</b> |      |                                               |                                                                                    |                                                                                       |
| Morpheus 1-48                                                                               | 2.0  | P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> | 45.1; 83.2; 84.3<br>(90)(90)(90)                                                   | ---                                                                                   |
| Morpheus 1-9                                                                                | 3.9  | C222 <sub>1</sub>                             | 90.9; 97.5; 146.4<br>(90)(90)(90)                                                  | ---                                                                                   |
| <b>Trombina-FPR incubada con exceso de FVIIIa3</b>                                          |      |                                               |                                                                                    |                                                                                       |
| Morpheus 1-12                                                                               | 1.7  | P2 <sub>1</sub>                               | 44.6; 73.9; 86.6<br>(90)(93,1)(90)                                                 | ---                                                                                   |
| Hampton<br>Research 1-30                                                                    | 3.2  | P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> | 65.4; 76.0; 124.2<br>(90)(90)(90)                                                  |  |
| <b>Trombina incubada con exceso de FVIIIa3 R1689Q</b>                                       |      |                                               |                                                                                    |                                                                                       |
| Morpheus 1-25                                                                               | 2.29 | P2 <sub>1</sub>                               | 66.1; 146.4; 68.0<br>(90)(94.2)(90)<br><br>*Estructura no descrita<br>previamente. |  |
| Morpheus 2-32                                                                               | 1.75 | P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> | 51.5; 77.7; 83.4<br>(90)(90)(90)                                                   |  |

|                                                              |     |                                               |                                     |                                                                                       |
|--------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Morpheus 2-25                                                | 3.2 | C222 <sub>1</sub>                             | 91.3; 97.4; 145.8<br>(90) (90)(90)  |    |
| <b>Trombina incubada con exceso de PAR1<sub>L</sub></b>      |     |                                               |                                     |                                                                                       |
| Morpheus 1-4                                                 | 1.9 | P2 <sub>1</sub>                               | 44.4; 73.9; 85.9<br>(90)(92.8)(90)  |    |
| Morpheus 1-16                                                | 2.6 | P2 <sub>1</sub>                               | 44.3; 74.04 86.1<br>(90)(93.42)(90) |    |
| Morpheus 2-40                                                | 1.9 | P2 <sub>1</sub>                               | 44.7; 74.8; 86.7<br>(90)(93.39)(90) |   |
| Pro-Plex 1-39                                                | 2.0 | C2                                            | 124.6; 47.8; 50.9<br>(90)(95.0)(90) |  |
| Pro-Plex 1-46                                                | 3.1 | C2                                            | 124.5; 47.8; 52.2<br>(90)(95.8)(90) |  |
| Morpheus 1-8                                                 | 1.6 | P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> | 44.2; 74.0; 86.0<br>(90)(90)(90)    |  |
| Morpheus 1-40                                                | 2.1 | P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> | 44.6; 75.1; 87.3<br>(90)(90)(90)    |  |
| <b>Trombina incubada con exceso de PAR1<sub>L</sub> R42Q</b> |     |                                               |                                     |                                                                                       |

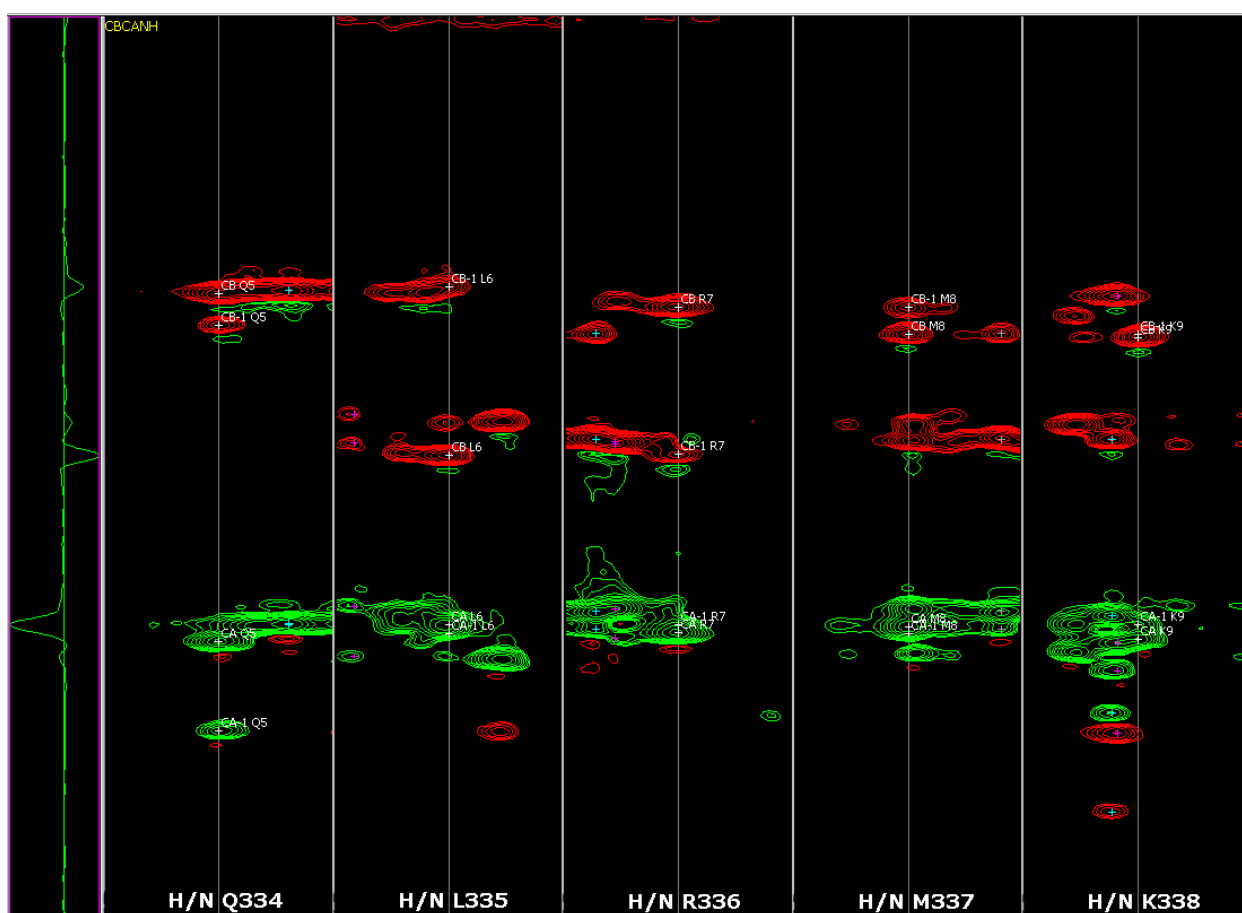
|                                                                    |     |                                                           |                                       |                                                                                       |
|--------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Morpheus 1-4                                                       | 2.3 | P <sub>2</sub> <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> | 44.5; 74.6; 86.2<br>(90)(90)(90)      |    |
| <b>Trombina incubada con exceso de PAR1<sub>L</sub> R42Q, S43P</b> |     |                                                           |                                       |                                                                                       |
| Morpheus 1-25                                                      | 2.6 | P <sub>2</sub> <sub>1</sub>                               | 66.2; 145.9; 68.67<br>(90)(94.82)(90) | ---                                                                                   |
| Morpheus 1-29                                                      | 2.3 | P <sub>2</sub> <sub>1</sub>                               | 66.6; 145.8; 66.7<br>(90)(93.9)(90)   |    |
| Morpheus 1-12                                                      | 3.1 | P <sub>2</sub> <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> | 44.9; 76.1; 86.6<br>(90)(90.16)(90)   |    |
| Morpheus 1-24                                                      | 1.7 | P <sub>2</sub> <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> | 52.1; 77.8; 83.5<br>(90)(90)(90)      |   |
| Morpheus 1-21                                                      | 3.5 | C222 <sub>1</sub>                                         | 91.0; 98.2; 145.9<br>(90)(90)(90)     |  |
| Morpheus 1-25                                                      | 3.2 | C222 <sub>1</sub>                                         | 91.0; 97.9; 146.1<br>(90)(90)(90)     |  |
| Morpheus 2-25                                                      | 3.0 | C222 <sub>1</sub>                                         | 91.2; 98.0; 145.0<br>(90)(89.5)(90)   |  |



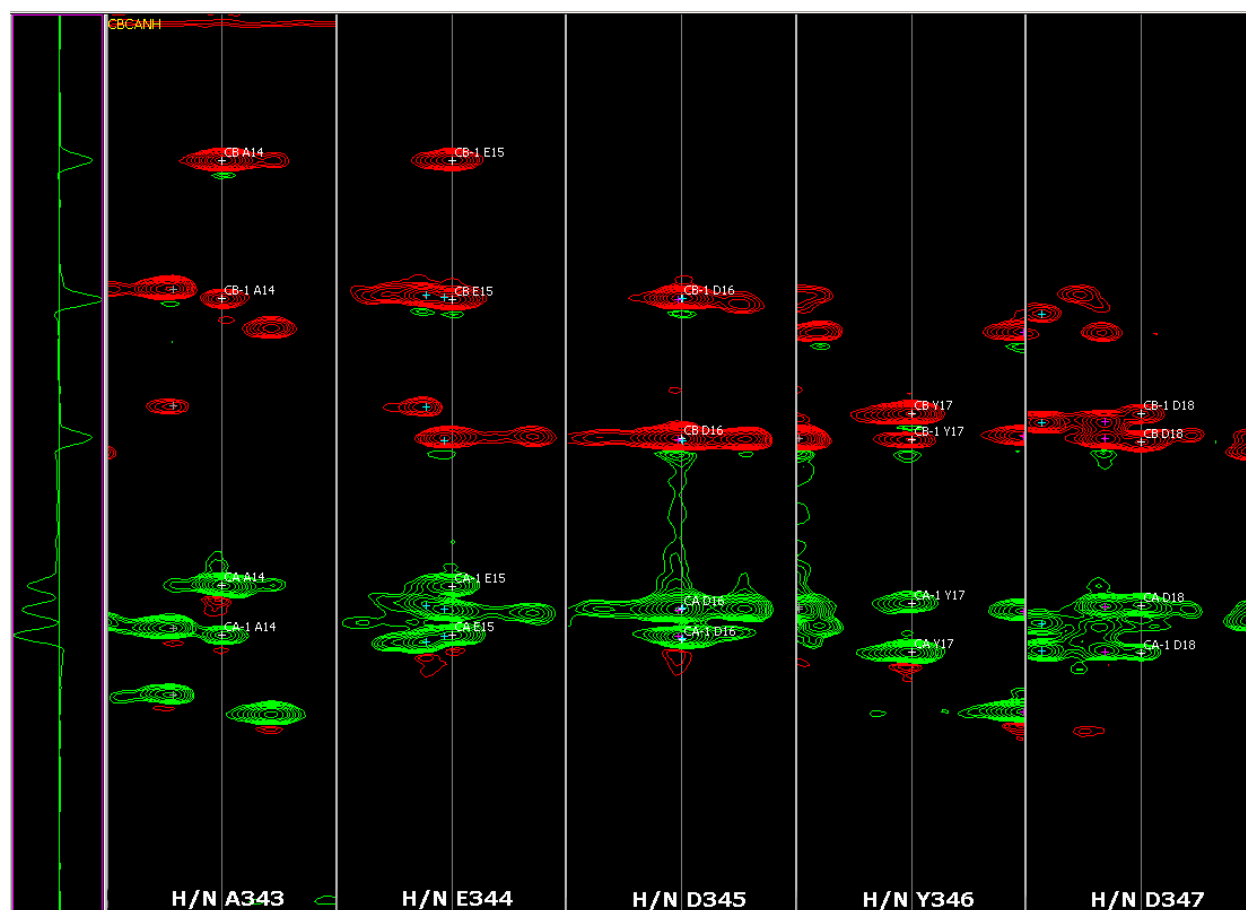
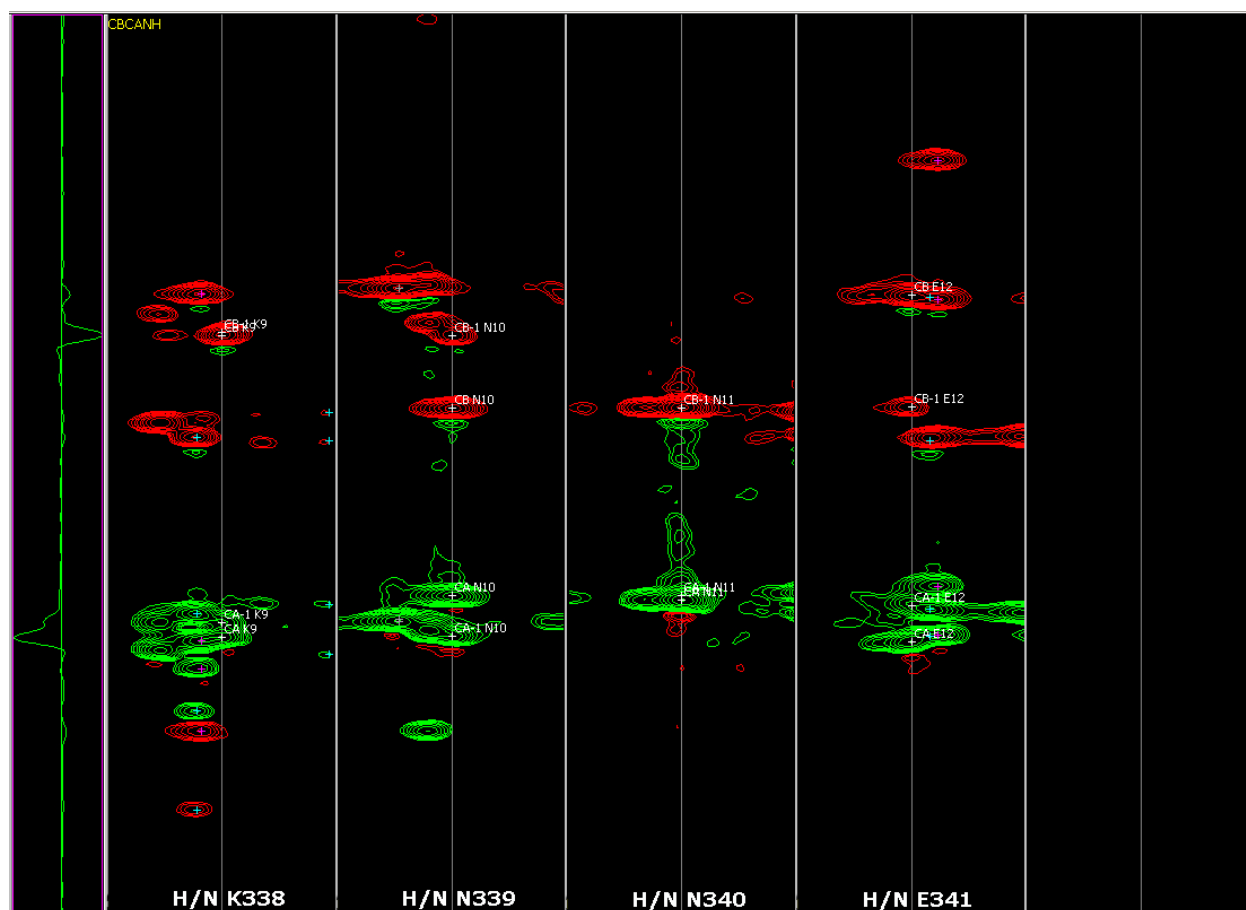


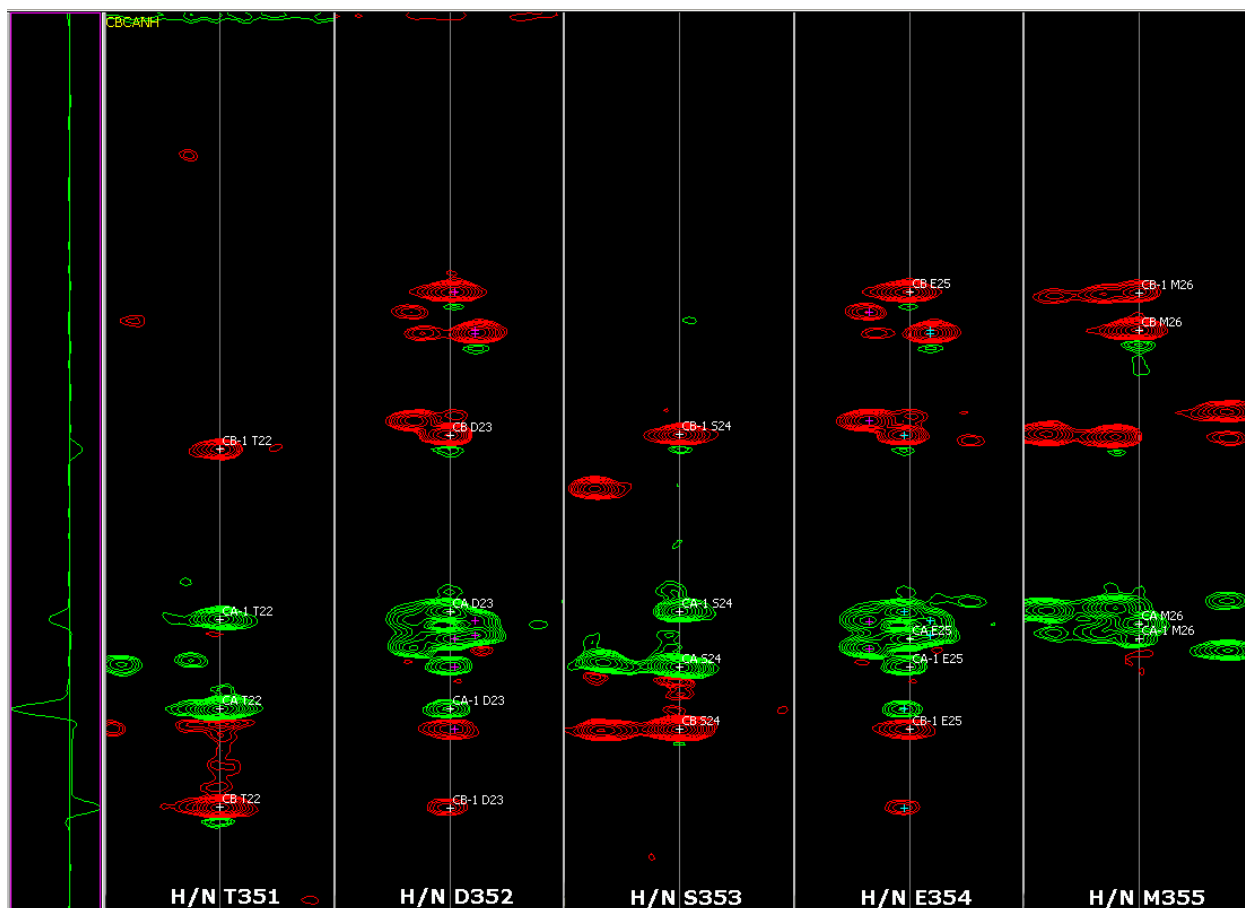
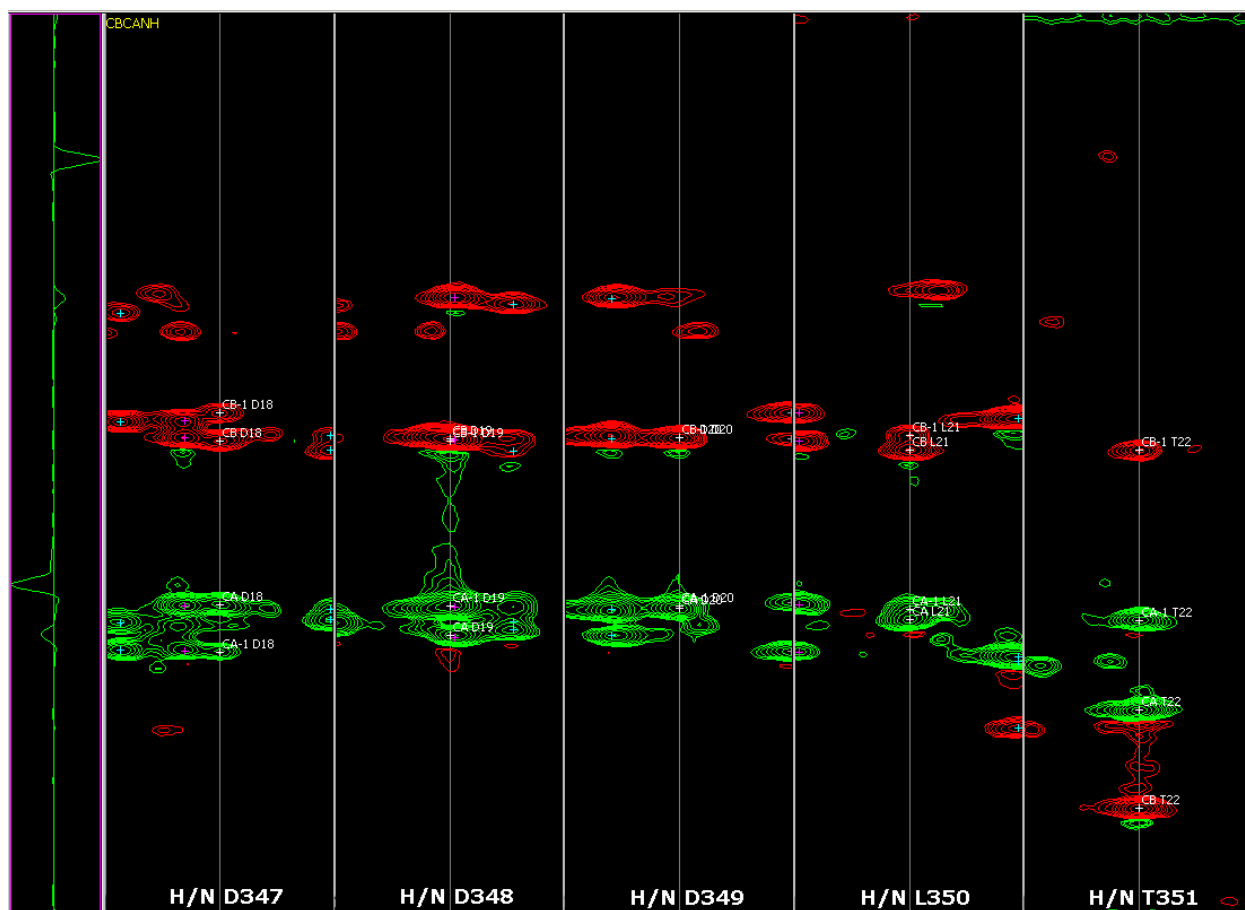
## Anexo 11: Resonancias de los carbonos $\alpha$ y $\beta$ asignados a los residuos del FVIIIa1 utilizando la herramienta *StripScope*

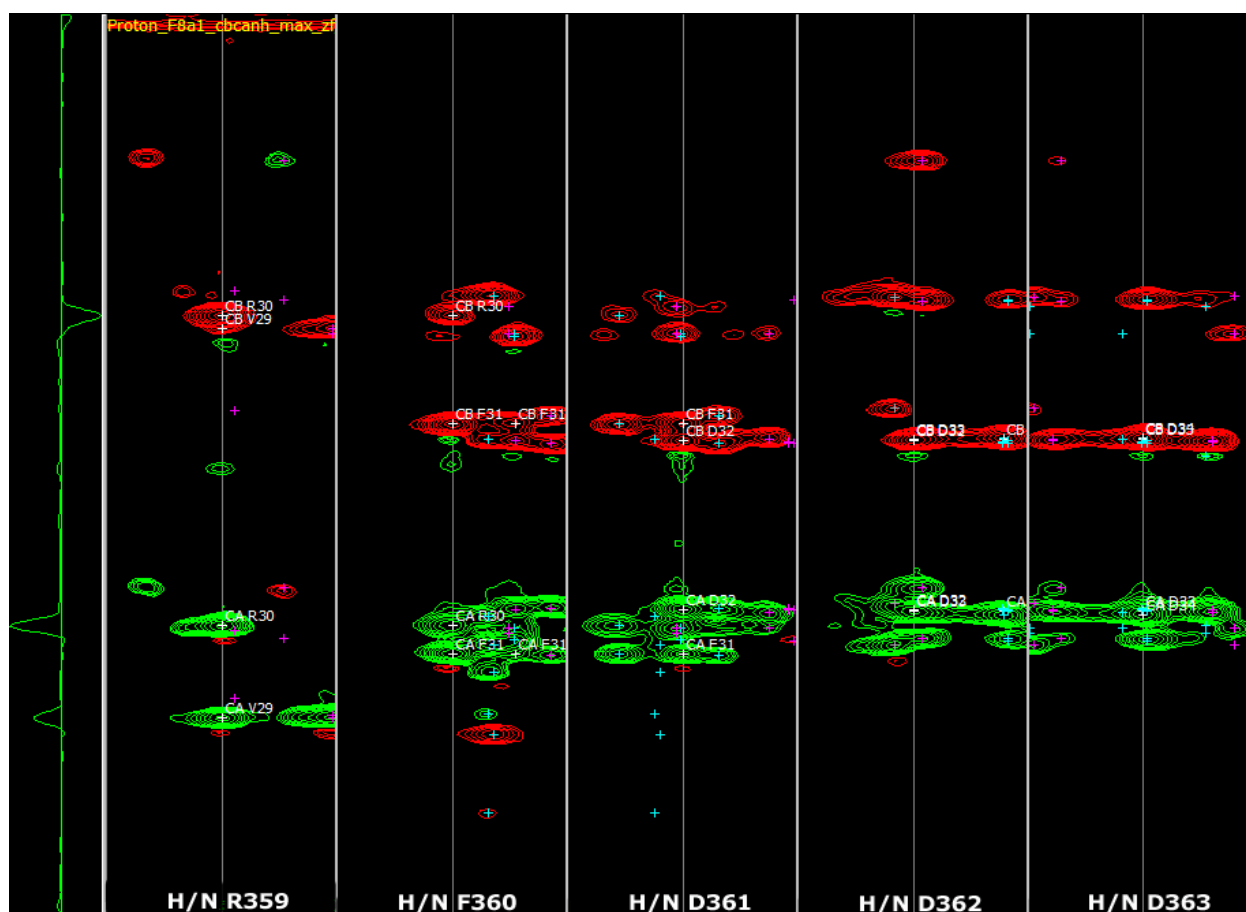
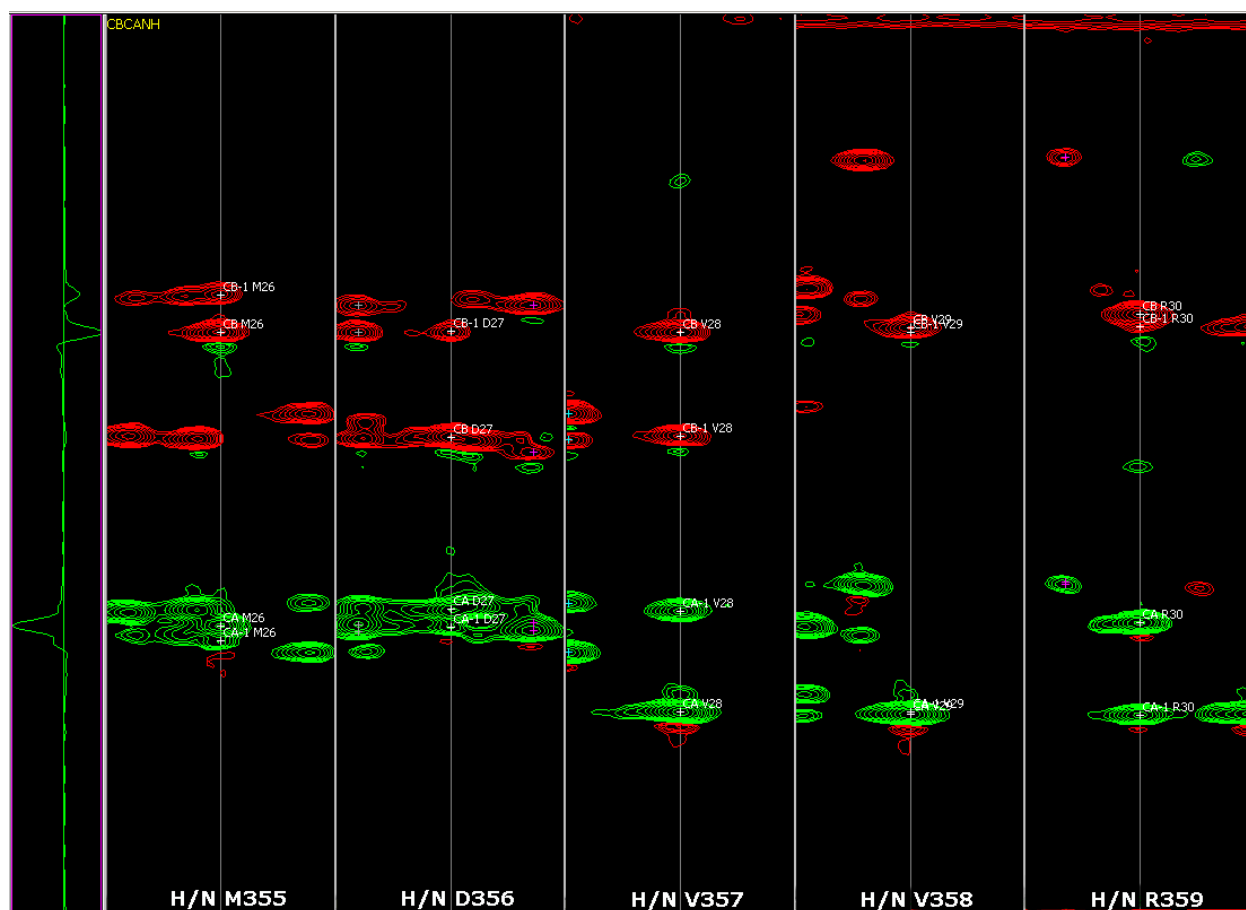
En las siguientes figuras se presenta el encadenamiento continuo de los residuos  $i$  e  $i-1$  a través de las resonancias de los carbonos  $\alpha_i$ ,  $\beta_i$ ,  $\alpha_{i-1}$  y  $\beta_{i-1}$  de los residuos correspondientes del FVIIIa1 libre asignados mediante protón ( $^1\text{H}$ ) con el uso de la herramienta *Stripscope* de CARA<sup>5</sup>. En cada figura los carbonos  $\alpha_i$  y  $\alpha_{i-1}$  se representan en color verde y los carbonos  $\beta_i$  y  $\beta_{i-1}$  en color rojo; asimismo, en la parte inferior de cada columna se indica el residuo del FVIIIa1 asignado (utilizando la nomenclatura de aminoácidos de una letra) mediante los ensayos de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ .

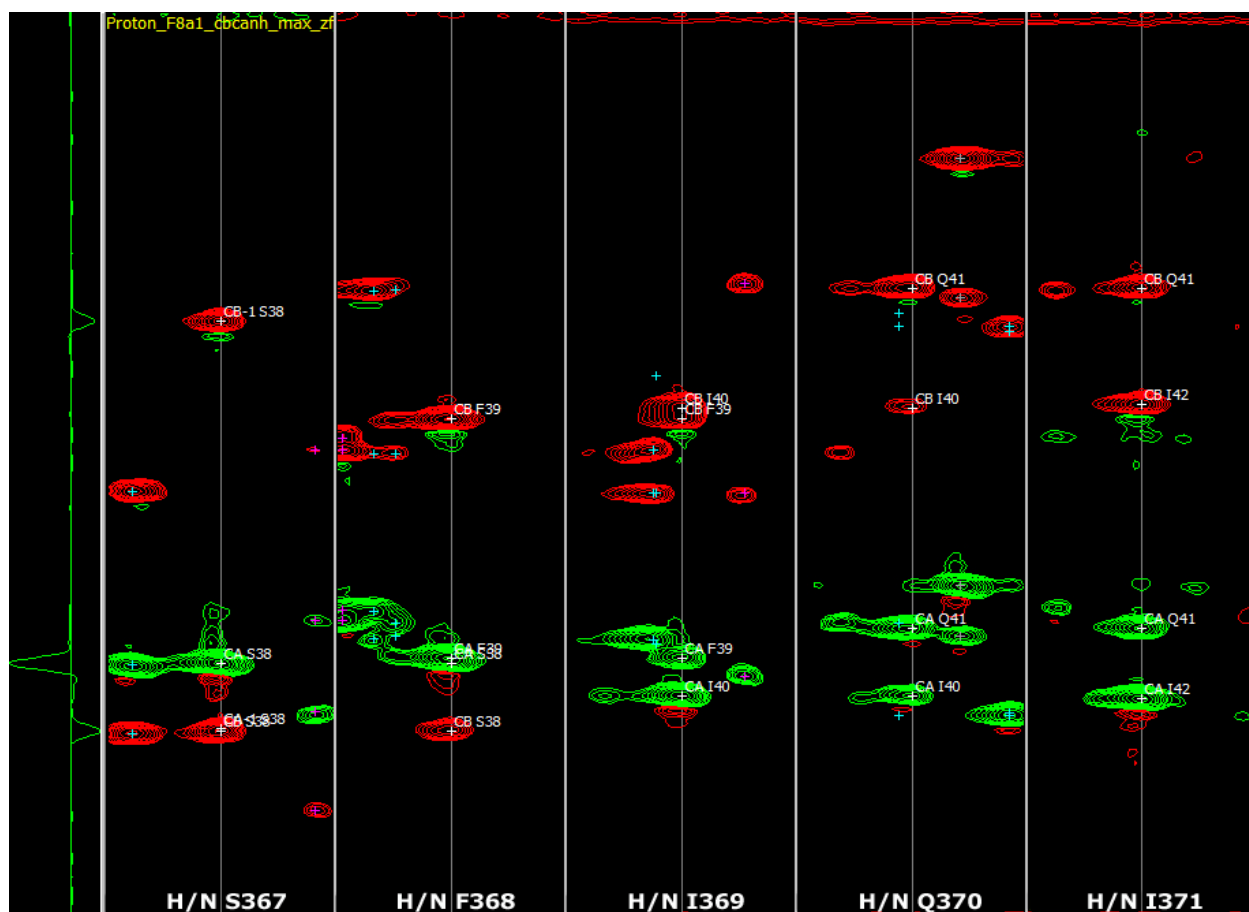
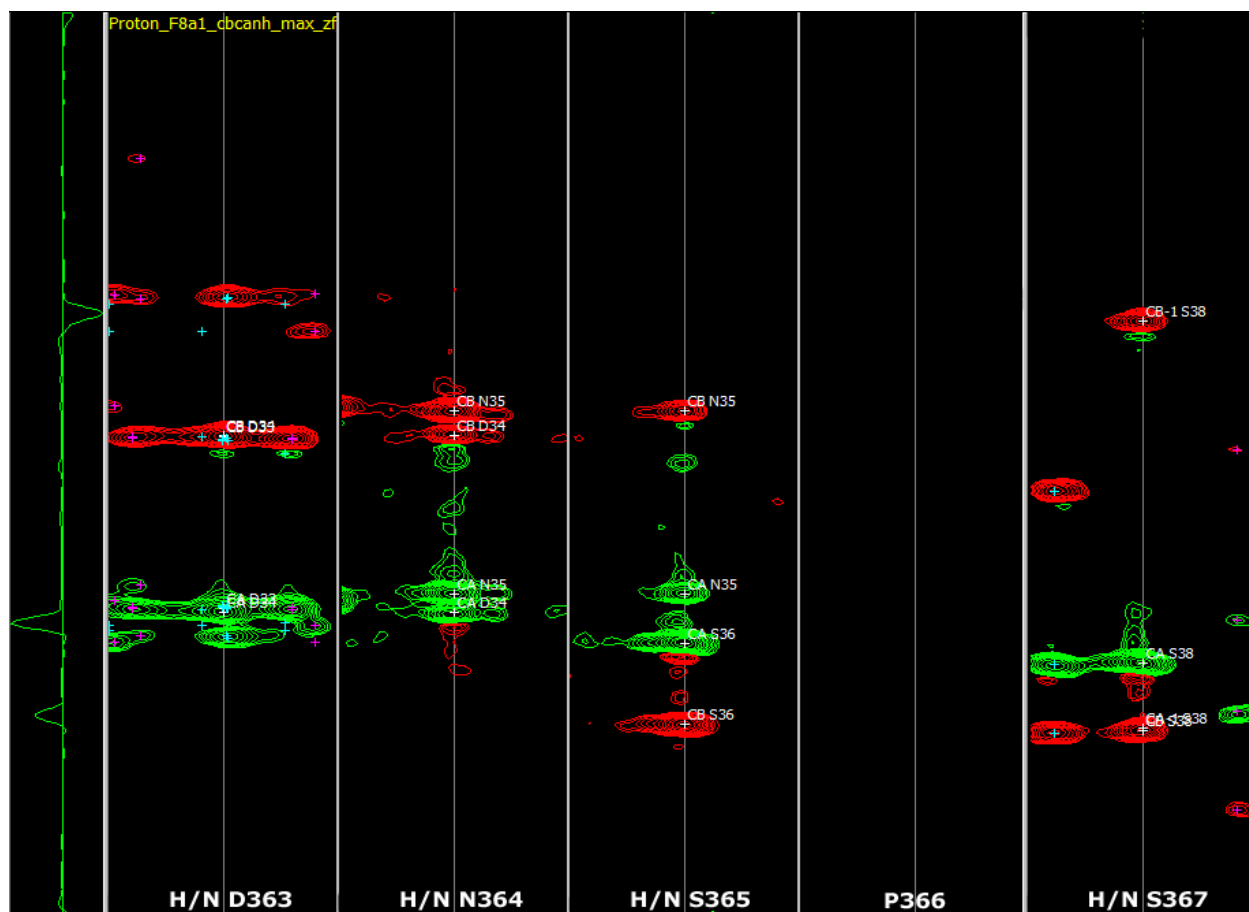


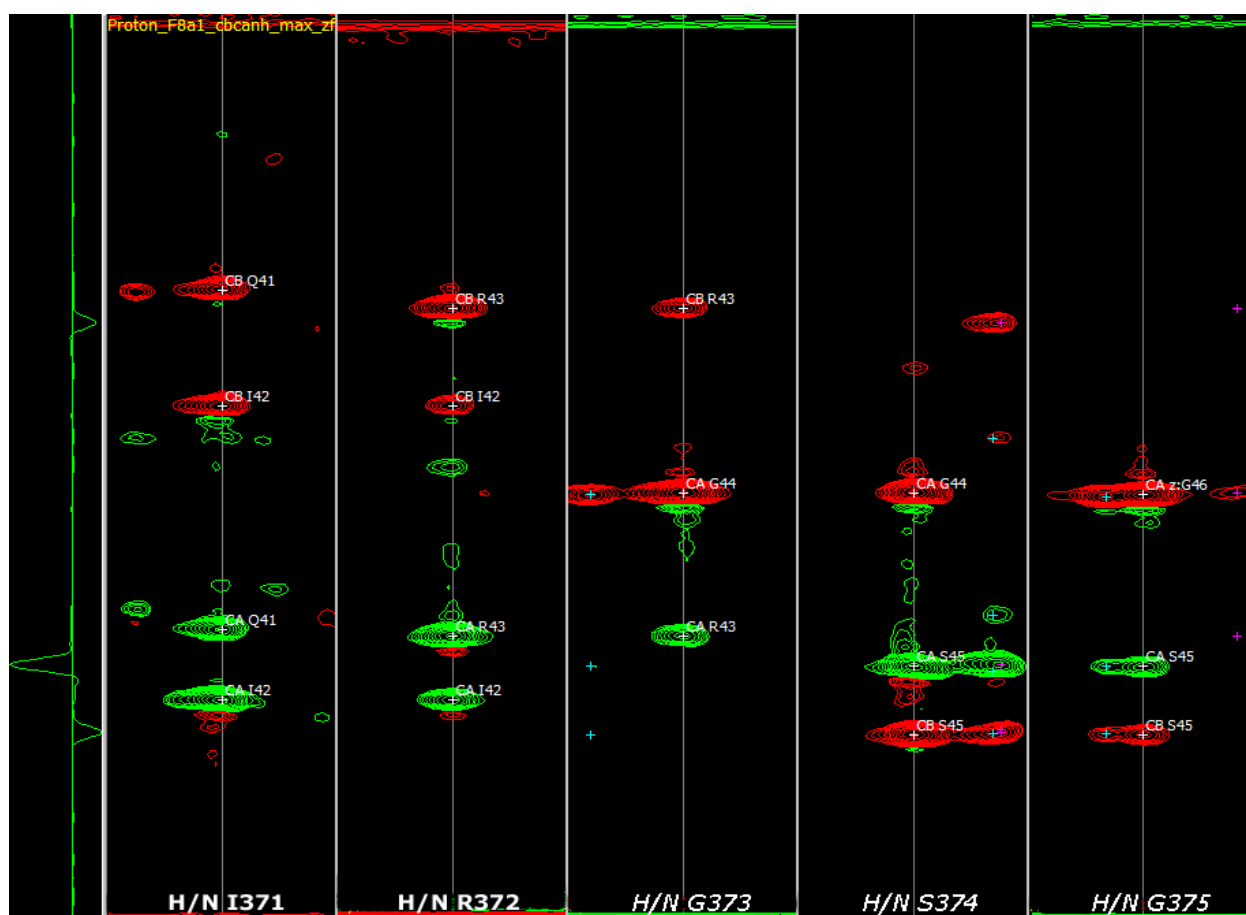
<sup>5</sup> Keller, Rochus. *Optimizing the Process of Nuclear Magnetic Resonance Spectrum Analysis and Computer Aided Resonance Assignment*. Disertación en el Instituto de Tecnología Federal Suizo de Zurich (ETH Zürich) para optar por el grado de Doctor en Ciencias Naturales. ETH No. 15947 (2004/2005).











## Anexo 12: Valores de los desplazamientos químicos observados de los residuos asignados del fragmento FVIIIa1 libre

Se presentan los valores de desplazamiento químico de los átomos de H, N, C $\alpha$ , C $\beta$  y Co del esqueleto de los residuos asignados del FVIIIa1. La asignación se llevó a cabo comparando los valores obtenidos en la Base de Datos de Resonancia Magnética (BMRB) actualizada al 10/10/2012 ([www.bmrwisc.edu](http://www.bmrwisc.edu)). Los residuos en *italica* correspondientes sólo al constructo, y no al conector a1 del FVIII humano.

| Residuo del FVIIIa1 | Tipo de átomo | Desplazamiento químico |
|---------------------|---------------|------------------------|
| <i>Ala322</i>       | CA            | 49.345                 |
| <i>Ala322</i>       | CB            | 16.163                 |
| <i>Ser323</i>       | H             | 8.490                  |
| <i>Ser323</i>       | N             | 115.322                |
| <i>Ser323</i>       | CA            | 55.001                 |
| <i>Ser323</i>       | CB            | 60.823                 |
| <i>Ser323</i>       | C             | 173.855                |
| <i>His324</i>       | H             | 8.513                  |
| <i>His324</i>       | N             | 120.325                |
| <i>His324</i>       | CA            | 52.097                 |
| <i>His324</i>       | CB            | 26.311                 |
| Pro330              | N             | 136.501                |
| Pro330              | CA            | 60.639                 |
| Pro330              | CB            | 28.956                 |
| Pro330              | C             | 177.010                |
| Glu331              | H             | 8.396                  |
| Glu331              | N             | 119.522                |
| Glu331              | CA            | 52.927                 |
| Glu331              | CB            | 26.053                 |
| Pro333              | N             | 136.794                |
| Pro333              | CA            | 60.580                 |
| Pro333              | CB            | 29.049                 |
| Pro333              | C             | 176.450                |
| Gln334              | H             | 8.663                  |
| Gln334              | N             | 120.015                |
| Gln334              | CA            | 53.623                 |
| Gln334              | CB            | 26.539                 |
| Gln334              | C             | 175.903                |
| Leu335              | H             | 7.963                  |
| Leu335              | N             | 122.588                |
| Leu335              | CB            | 39.146                 |
| Leu335              | CA            | 52.299                 |
| Leu335              | C             | 176.993                |

| Residuo del FVIIIa1 | Tipo de átomo | Desplazamiento químico |
|---------------------|---------------|------------------------|
| Arg336              | H             | 7.997                  |
| Arg336              | N             | 121.103                |
| Arg336              | CA            | 52.889                 |
| Arg336              | CB            | 27.611                 |
| Arg336              | C             | 175.959                |
| Met337              | H             | 8.190                  |
| Met337              | N             | 121.222                |
| Met337              | CA            | 52.456                 |
| Met337              | CB            | 29.713                 |
| Met337              | C             | 176.047                |
| Lys338              | H             | 8.185                  |
| Lys338              | N             | 122.253                |
| Lys338              | CA            | 53.425                 |
| Lys338              | CB            | 29.976                 |
| Lys338              | C             | 176.062                |
| Asn339              | H             | 8.372                  |
| Asn339              | N             | 119.507                |
| Asn339              | CA            | 50.202                 |
| Asn339              | CB            | 35.619                 |
| Asn339              | C             | 174.845                |
| Asn340              | H             | 8.256                  |
| Asn340              | N             | 118.221                |
| Asn340              | CA            | 50.527                 |
| Asn340              | CB            | 35.447                 |
| Asn340              | C             | 175.073                |
| Glu341              | H             | 8.184                  |
| Glu341              | N             | 119.878                |
| Glu341              | CA            | 53.798                 |
| Glu341              | CB            | 26.869                 |
| Ala343              | H             | 8.054                  |
| Ala343              | N             | 124.573                |
| Ala343              | CA            | 49.406                 |
| Ala343              | CB            | 16.382                 |



| Residuo del FVIIIa1 | Tipo de átomo | Desplazamiento químico |
|---------------------|---------------|------------------------|
| Ala343              | C             | 177.475                |
| Glu344              | H             | 8.156                  |
| Glu344              | N             | 119.753                |
| Glu344              | CB            | 27.192                 |
| Glu344              | CA            | 53.274                 |
| Glu344              | C             | 175.633                |
| Asp345              | H             | 8.061                  |
| Asp345              | N             | 120.515                |
| Asp345              | CA            | 51.256                 |
| Asp345              | CB            | 37.986                 |
| Asp345              | C             | 175.559                |
| Tyr346              | H             | 7.866                  |
| Tyr346              | N             | 120.214                |
| Tyr346              | CA            | 54.600                 |
| Tyr346              | CB            | 36.045                 |
| Tyr346              | C             | 175.135                |
| Asp347              | H             | 8.143                  |
| Asp347              | N             | 121.730                |
| Asp347              | CA            | 50.947                 |
| Asp347              | CB            | 38.237                 |
| Asp347              | C             | 175.526                |
| Asp348              | H             | 8.066                  |
| Asp348              | N             | 120.904                |
| Asp348              | CB            | 38.105                 |
| Asp348              | CA            | 53.331                 |
| Asp348              | C             | 175.346                |
| Asp349              | H             | 7.990                  |
| Asp349              | N             | 120.245                |
| Asp349              | CA            | 51.260                 |
| Asp349              | CB            | 38.018                 |
| Asp349              | C             | 176.198                |
| Leu350              | H             | 8.022                  |
| Leu350              | N             | 121.945                |
| Leu350              | CA            | 52.085                 |
| Leu350              | CB            | 38.917                 |
| Leu350              | C             | 177.674                |
| Thr351              | H             | 7.988                  |
| Thr351              | N             | 114.346                |
| Thr351              | CA            | 59.175                 |
| Thr351              | CB            | 66.801                 |
| Thr351              | C             | 174.392                |
| Asp352              | H             | 8.213                  |
| Asp352              | N             | 122.405                |
| Asp352              | CA            | 51.581                 |

| Residuo del FVIIIa1 | Tipo de átomo | Desplazamiento químico |
|---------------------|---------------|------------------------|
| Asp352              | CB            | 37.871                 |
| Asp352              | C             | 176.343                |
| Ser353              | H             | 8.100                  |
| Ser353              | N             | 116.108                |
| Ser353              | CA            | 55.887                 |
| Ser353              | CB            | 60.738                 |
| Ser353              | C             | 174.812                |
| Glu354              | H             | 8.208                  |
| Glu354              | N             | 122.175                |
| Glu354              | CA            | 53.704                 |
| Glu354              | CB            | 26.783                 |
| Glu354              | C             | 176.488                |
| Met355              | H             | 7.965                  |
| Met355              | N             | 119.785                |
| Met355              | CA            | 52.525                 |
| Met355              | CB            | 29.713                 |
| Met355              | C             | 175.848                |
| Asp356              | H             | 8.088                  |
| Asp356              | N             | 121.174                |
| Asp356              | CA            | 51.266                 |
| Asp356              | CB            | 37.884                 |
| Asp356              | C             | 175.959                |
| Val357              | H             | 7.743                  |
| Val357              | N             | 120.055                |
| Val357              | CA            | 59.221                 |
| Val357              | CB            | 29.724                 |
| Val357              | C             | 175.808                |
| Val358              | H             | 8.000                  |
| Val358              | N             | 124.970                |
| Val358              | CA            | 59.400                 |
| Val358              | CB            | 29.360                 |
| Val358              | C             | 175.471                |
| Arg359              | H             | 8.122                  |
| Arg359              | N             | 125.399                |
| Arg359              | CA            | 52.316                 |
| Arg359              | CB            | 28.316                 |
| Arg359              | C             | 175.502                |
| Phe360              | H             | 8.252                  |
| Phe360              | N             | 121.976                |
| Phe360              | CA            | 54.477                 |
| Phe360              | CB            | 36.723                 |
| Phe360              | C             | 175.256                |
| Asp361              | H             | 8.183                  |
| Asp361              | N             | 121.548                |

| Residuo del FVIIIa1 | Tipo de átomo | Desplazamiento químico | Residuo del FVIIIa1 | Tipo de átomo | Desplazamiento químico |
|---------------------|---------------|------------------------|---------------------|---------------|------------------------|
| Asp361              | CA            | 51.016                 | Gln370              | H             | 8.107                  |
| Asp361              | CB            | 38.011                 | Gln370              | N             | 124.597                |
| Asp361              | C             | 175.758                | Gln370              | CA            | 52.703                 |
| Asp362              | H             | 8.165                  | Gln370              | CB            | 26.361                 |
| Asp362              | N             | 119.948                | Gln370              | C             | 175.683                |
| Asp362              | CA            | 51.217                 | Ile371              | H             | 8.113                  |
| Asp362              | CB            | 37.920                 | Ile371              | N             | 123.501                |
| Asp362              | C             | 175.672                | Ile371              | CA            | 58.129                 |
| Asp363              | H             | 8.065                  | Ile371              | CB            | 35.352                 |
| Asp363              | N             | 120.317                | Ile371              | C             | 176.207                |
| Asp363              | CB            | 37.802                 | Arg372              | H             | 8.309                  |
| Asp363              | CA            | 51.474                 | Arg372              | N             | 125.772                |
| Asp363              | C             | 175.922                | Arg372              | CA            | 53.169                 |
| Asn364              | H             | 8.109                  | Arg372              | CB            | 27.782                 |
| Asn364              | N             | 118.284                | Arg372              | C             | 176.608                |
| Asn364              | CA            | 50.028                 | Gly373              | H             | 8.277                  |
| Asn364              | CB            | 35.861                 | Gly373              | N             | 110.511                |
| Asn364              | C             | 174.890                | Gly373              | CA            | 42.100                 |
| Ser365              | H             | 7.952                  | Gly373              | C             | 173.932                |
| Ser365              | N             | 117.093                | Ser374              | H             | 8.188                  |
| Ser365              | CA            | 53.856                 | Ser374              | N             | 115.521                |
| Ser365              | CB            | 60.146                 | Ser374              | CB            | 60.822                 |
| Ser365              | C             | 172.766                | Ser374              | CA            | 55.568                 |
| Pro366              | N             | 137.992                | Ser374              | C             | 175.117                |
| Pro366              | CA            | 60.467                 | Gly375              | H             | 8.379                  |
| Pro366              | CB            | 28.965                 | Gly375              | N             | 111.177                |
| Pro366              | C             | 176.850                | Gly375              | CA            | 42.249                 |
| Ser367              | H             | 8.091                  | Gly375              | C             | 173.218                |
| Ser367              | N             | 115.052                | Cys376              | H             | 7.661                  |
| Ser367              | CA            | 55.391                 | Cys376              | N             | 122.548                |
| Ser367              | CB            | 60.618                 | Cys376              | CA            | 56.401                 |
| Ser367              | C             | 174.076                | Cys376              | CB            | 26.009                 |
| Phe368              | H             | 7.902                  | Cys376              | C             | 178.651                |
| Phe368              | N             | 122.103                |                     |               |                        |
| Phe368              | CA            | 55.049                 |                     |               |                        |
| Phe368              | CB            | 36.498                 |                     |               |                        |
| Phe368              | C             | 175.280                |                     |               |                        |
| Ile369              | H             | 7.731                  |                     |               |                        |
| Ile369              | N             | 123.017                |                     |               |                        |
| Ile369              | CA            | 57.935                 |                     |               |                        |
| Ile369              | CB            | 35.647                 |                     |               |                        |
| Ile369              | C             | 175.500                |                     |               |                        |



### Anexo 13: Valores de los desplazamientos químicos observados de los residuos asignados del fragmento FVIIIa1 en presencia de trombina

Se presentan los valores de desplazamiento químico de los átomos de H, N, C $\alpha$ , C $\beta$  y Co del esqueleto de los residuos asignados del FVIIIa1 en presencia de 20  $\mu$ M de trombina libre. La asignación se llevó a cabo comparando los valores obtenidos en la base de datos BMRB ([www.bmrb.wisc.edu](http://www.bmrb.wisc.edu)). Los residuos en *italica* correspondientes sólo al constructo, y no al conector a1 del FVIII humano.

| Residuo del FVIIIa1 | Tipo de átomo | Desplazamiento químico | Residuo del FVIIIa1 | Tipo de átomo | Desplazamiento químico |
|---------------------|---------------|------------------------|---------------------|---------------|------------------------|
| <i>Ser323</i>       | H             | 8.575                  | Leu335              | C             | 176.133                |
| <i>Ser323</i>       | N             | 115.490                | Arg336              | H             | 7.814                  |
| <i>Ser323</i>       | CB            | 63.422                 | Arg336              | N             | 126.901                |
| <i>Ser323</i>       | CA            | 57.859                 | Arg336              | CA            | 56.898                 |
| <i>Ser323</i>       | C             | 173.873                | Arg336              | CB            | 31.322                 |
| <i>His324</i>       | H             | 8.553                  | Lys338              | H             | 8.688                  |
| <i>His324</i>       | N             | 120.614                | Lys338              | N             | 124.222                |
| <i>His324</i>       | CA            | 54.932                 | Lys338              | CA            | 56.135                 |
| <i>His324</i>       | CB            | 29.165                 | Lys338              | CB            | 32.840                 |
| Pro330              | N             | 136.906                | Lys338              | C             | 175.717                |
| Pro330              | CA            | 63.150                 | Asn339              | H             | 8.613                  |
| Pro330              | CB            | 31.917                 | Asn339              | N             | 120.747                |
| Pro330              | C             | 176.511                | Asn339              | CA            | 53.016                 |
| Glu331              | H             | 8.632                  | Asn339              | CB            | 38.459                 |
| Glu331              | N             | 121.075                | Asn339              | C             | 174.815                |
| Glu331              | CA            | 56.087                 | Asn340              | H             | 8.384                  |
| Glu331              | CB            | 29.752                 | Asn340              | N             | 118.671                |
| Glu331              | C             | 176.138                | Asn340              | CA            | 53.355                 |
| Glu332              | H             | 8.283                  | Asn340              | CB            | 38.345                 |
| Glu332              | N             | 123.552                | Asn340              | C             | 175.097                |
| Glu332              | CA            | 54.170                 | Glu341              | H             | 8.300                  |
| Glu332              | CB            | 29.328                 | Glu341              | N             | 120.022                |
| Pro333              | N             | 137.138                | Glu341              | CA            | 56.621                 |
| Pro333              | CA            | 62.952                 | Glu341              | CB            | 29.599                 |
| Pro333              | CB            | 31.917                 | Glu341              | C             | 176.303                |
| Pro333              | C             | 176.560                | Glu342              | H             | 8.111                  |
| Gln334              | H             | 8.452                  | Glu342              | N             | 120.300                |
| Gln334              | N             | 120.826                | Glu342              | CA            | 56.084                 |
| Gln334              | CA            | 55.129                 | Glu342              | CB            | 29.826                 |
| Gln334              | CB            | 29.114                 | Glu342              | C             | 175.920                |
| Gln334              | C             | 175.675                | Ala343              | H             | 8.081                  |
| Leu335              | H             | 8.255                  | Ala343              | N             | 124.383                |
| Leu335              | N             | 124.595                | Ala343              | CA            | 52.096                 |
| Leu335              | CB            | 41.871                 | Ala343              | CB            | 19.133                 |
| Leu335              | CA            | 54.921                 | Ala343              | C             | 177.474                |

| Residuo del FVIIIa1 | Tipo de átomo | Desplazamiento químico |
|---------------------|---------------|------------------------|
| Glu344              | H             | 8.242                  |
| Glu344              | N             | 119.801                |
| Glu344              | CB            | 29.899                 |
| Glu344              | CA            | 56.100                 |
| Glu344              | C             | 175.686                |
| Asp345              | H             | 8.147                  |
| Asp345              | N             | 120.649                |
| Asp345              | CA            | 53.613                 |
| Asp345              | CB            | 40.723                 |
| Asp345              | C             | 175.374                |
| Tyr346              | H             | 7.931                  |
| Tyr346              | N             | 120.479                |
| Tyr346              | CA            | 57.449                 |
| Tyr346              | CB            | 38.632                 |
| Tyr346              | C             | 175.160                |
| Asp347              | H             | 8.157                  |
| Asp347              | N             | 122.267                |
| Asp347              | CA            | 53.674                 |
| Asp347              | CB            | 40.878                 |
| Asp347              | C             | 175.575                |
| Asp348              | H             | 8.073                  |
| Asp348              | N             | 120.384                |
| Asp348              | CA            | 54.124                 |
| Asp348              | CB            | 40.842                 |
| Asp348              | C             | 176.001                |
| Asp349              | H             | 8.159                  |
| Asp349              | N             | 120.343                |
| Asp349              | CB            | 40.609                 |
| Asp349              | CA            | 54.350                 |
| Asp349              | C             | 176.208                |
| Leu350              | H             | 8.084                  |
| Leu350              | N             | 122.182                |
| Leu350              | CA            | 54.882                 |
| Leu350              | CB            | 41.632                 |
| Leu350              | C             | 177.684                |
| Thr351              | H             | 8.054                  |
| Thr351              | N             | 114.869                |
| Thr351              | CA            | 62.145                 |
| Thr351              | CB            | 69.528                 |
| Thr351              | C             | 174.379                |
| Asp352              | H             | 8.302                  |
| Asp352              | N             | 122.565                |
| Asp352              | CA            | 54.279                 |
| Asp352              | CB            | 40.619                 |
| Asp352              | C             | 176.344                |
| Ser353              | H             | 8.172                  |
| Ser353              | N             | 116.386                |
| Ser353              | CA            | 58.687                 |
| Ser353              | CB            | 63.388                 |

| Residuo del FVIIIa1 | Tipo de átomo | Desplazamiento químico |
|---------------------|---------------|------------------------|
| Ser353              | C             | 174.780                |
| Glu354              | H             | 8.294                  |
| Glu354              | N             | 122.205                |
| Glu354              | CA            | 56.404                 |
| Glu354              | CB            | 29.565                 |
| Glu354              | C             | 176.491                |
| Met355              | H             | 8.044                  |
| Met355              | N             | 120.001                |
| Met355              | CB            | 32.590                 |
| Met355              | CA            | 55.323                 |
| Met355              | C             | 175.862                |
| Asp356              | H             | 8.173                  |
| Asp356              | N             | 121.362                |
| Asp356              | CA            | 54.221                 |
| Asp356              | CB            | 40.496                 |
| Asp356              | C             | 175.786                |
| Val357              | H             | 7.824                  |
| Val357              | N             | 120.235                |
| Val357              | CA            | 62.101                 |
| Val357              | CB            | 32.533                 |
| Val357              | C             | 175.857                |
| Val358              | H             | 8.084                  |
| Val358              | N             | 125.085                |
| Val358              | CB            | 32.185                 |
| Val358              | CA            | 62.152                 |
| Val358              | C             | 175.500                |
| Arg359              | H             | 8.188                  |
| Arg359              | N             | 125.430                |
| Arg359              | CB            | 31.062                 |
| Arg359              | CA            | 55.116                 |
| Arg359              | C             | 175.506                |
| Phe360              | H             | 8.308                  |
| Phe360              | N             | 121.990                |
| Phe360              | CA            | 57.315                 |
| Phe360              | CB            | 39.565                 |
| Phe360              | C             | 175.220                |
| Asp361              | H             | 8.253                  |
| Asp361              | N             | 121.655                |
| Asp361              | CA            | 53.785                 |
| Asp361              | CB            | 40.822                 |
| Asp361              | C             | 175.486                |
| Asp362              | H             | 8.084                  |
| Asp362              | N             | 121.277                |
| Asp362              | CA            | 54.109                 |
| Asp362              | CB            | 40.854                 |
| Asp362              | C             | 175.720                |
| Asp363              | H             | 8.221                  |
| Asp363              | N             | 120.176                |
| Asp363              | CB            | 40.585                 |

| Residuo del FVIIIa1 | Tipo de átomo | Desplazamiento químico | Residuo del FVIIIa1 | Tipo de átomo | Desplazamiento químico |
|---------------------|---------------|------------------------|---------------------|---------------|------------------------|
| Asp363              | CA            | 54.126                 | Ile369              | H             | 7.797                  |
| Asp363              | C             | 175.954                | Ile369              | N             | 123.462                |
| Asn364              | H             | 8.182                  | Ile369              | CA            | 60.868                 |
| Asn364              | N             | 118.412                | Ile369              | CB            | 38.327                 |
| Asn364              | CB            | 38.616                 | Ile369              | C             | 175.209                |
| Asn364              | CA            | 52.876                 | Gln370              | H             | 7.910                  |
| Asn364              | C             | 174.868                | Gln370              | N             | 130.722                |
| Ser365              | H             | 8.029                  | Gln370              | CA            | 57.054                 |
| Ser365              | N             | 117.186                | Gln370              | CB            | 31.315                 |
| Ser365              | CB            | 62.880                 | Ser374              | H             | 8.672                  |
| Ser365              | CA            | 56.569                 | Ser374              | N             | 115.605                |
| Pro366              | N             | 138.023                | Ser374              | CB            | 63.411                 |
| Pro366              | CA            | 62.448                 | Ser374              | CA            | 58.127                 |
| Pro366              | CB            | 31.813                 | Ser374              | C             | 174.742                |
| Pro366              | C             | 176.773                | Gly375              | H             | 8.506                  |
| Ser367              | H             | 8.164                  | Gly375              | N             | 111.413                |
| Ser367              | N             | 115.234                | Gly375              | CA            | 44.909                 |
| Ser367              | CA            | 57.933                 | Gly375              | C             | 173.109                |
| Ser367              | CB            | 63.395                 | Cys376              | H             | 7.786                  |
| Ser367              | C             | 173.957                | Cys376              | N             | 122.575                |
| Phe368              | H             | 7.987                  | Cys376              | CA            | 59.094                 |
| Phe368              | N             | 122.176                | Cys376              | CB            | 28.725                 |
| Phe368              | CA            | 57.420                 |                     |               |                        |
| Phe368              | CB            | 39.363                 |                     |               |                        |
| Phe368              | C             | 175.055                |                     |               |                        |

