

<https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-4-471-482>

МЕТАЛЛОПРОТЕАЗА ADAMTS-13

Колосков А. В.*, Мангушло А. А.

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 191015, Санкт-Петербург, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Значение открытия металлопротеазы ADAMTS-13 выходит за рамки представления о ее ключевой роли в патогенезе тромбоцитарной тромбоцитопенической пурпуры (ТТП), имеются данные о наличии связи между снижением активности ADAMTS-13 и тромбоцитарными событиями при остром инфаркте миокарда и ишемическом инсульте.

Цель обзора — обобщение современной информации о структуре и функции металлопротеазы ADAMTS-13.

Основные сведения. Биологической функцией протеазы ADAMTS-13 является расщепление сверхкрупных мультимеров фактора Виллебранда. Основой для понимания функции расщепляющей фактор Виллебранда протеазы явилась демонстрация того, что дефицит ее является причиной развития ТТП. ADAMTS-13 имеет доменную структуру. Установлено функциональное значение большинства доменов ADAMTS-13, ключевая роль взаимодействия ADAMTS-13 и WF в регуляции гемостаза. Конформационная активация протеазы ADAMTS-13 фактором Виллебранда является важным аспектом реализации ее функции. После попадания в кровяной ток сверхкрупные мультимеры фактора Виллебранда быстро принимают закрытую конформацию, которая становится очень устойчивой к протеолиту ADAMTS-13 при отсутствии напряжения сдвига. Плазменные сверхкрупные мультимеры фактора Виллебранда восстанавливают свою чувствительность к ADAMTS-13 при воздействии высокого напряжения сдвига жидкости, которое разворачивает центральный домен A2 фактора Виллебранда. Разворачивание молекулы фактора Виллебранда под воздействием напряжения сдвига открывают в домене A2 ранее скрытые экзосайты, которые постепенно увеличивают сродство связывания между ADAMTS-13 и фактором Виллебранда. Механизм выработки аутоантител против ADAMTS-13 неизвестен и требует дальнейшего изучения. Маскировка криптоэпитопов в замкнутой конформации ADAMTS-13 предотвращает образование аутоантител. Раннее антигенное распознавание ADAMTS-13 происходит через поверхностные обнаженные эпитопы в С-концевых доменах. Более подробная информация о механизмах взаимодействия между ADAMTS-13 и фактором Виллебранда может улучшить понимание механизмов регуляции свертывающей системы.

Ключевые слова: ADAMTS-13, фактор Виллебранда, гемостаз

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Колосков А.В., Мангушло А.А. Металлопротеаза ADAMTS-13. Гематология и трансфузиология. 2019; 64(4): 471–482. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-4-471-482>

METALLOPROTEASE ADAMTS-13

Koloskov A. V.*, Mangushlo A. A.

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, 191015, Russia

ABSTRACT

Introduction. The significance of ADAMTS-13 extends beyond its key role in the pathogenesis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP); there is evidence of a relationship between a decrease in the ADAMTS-13 activity and thrombotic events in acute myocardial infarction and ischemic stroke.

Aim. To generalise available information on the structure and function of the metalloprotease ADAMTS-13.

General findings. The biological function of ADAMTS-13 consists in the cleavage of ultra-large von Willebrand factor (vWF) multimers. The fact that its deficiency causes the development of TTP provides a basis for understanding the function of vWF-cleaving protease. ADAMTS-13 has a domain structure. The functional roles of most ADAMTS-13 domains, as well as the key role of the ADAMTS-13-vWF interaction in the regulation of haemostasis, are defined. The conformational activation of ADAMTS-13 by vWF constitutes an important aspect of its function. After getting into the bloodstream, ultra-large vWF multimers quickly adopt a closed conformation, which becomes very resistant to ADAMTS-13 proteolysis in the absence of shear stress. Ultra-large plasma vWF multimers regain their sensitivity to ADAMTS-13 after being exposed to high fluid shear stress, which unfolds the central vWF-A2 domain. The unfolding of a vWF molecule under shear stress conditions reveals previously hidden exosites in domain A2, which gradually increase the binding affinity between ADAMTS-13 and vWF. The mechanism underlying the production of autoantibodies against ADAMTS-13 is unknown and requires further study. The masking of cryptic epitopes in the closed conformation of ADAMTS-13 prevents the formation of autoantibodies. Early antigen recognition of ADAMTS-13 occurs through surface-exposed epitopes in the C-terminal domains. More detailed information on the mechanisms underlying the interaction between ADAMTS-13 and the vWF can improve the understanding of mechanisms involved in the regulation of the coagulation system.

Keywords: ADAMTS-13, von Willebrand factor, haemostasis

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Koloskov A.V., Mangushlo A.A. The Metalloprotease ADAMTS-13. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2019; 64(4): 471–482 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-4-471-482>

Введение

Все большее количество клинических и экспериментальных исследований свидетельствуют о существенной роли металлопротеазы ADAMTS-13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains, member 13) не только в патогенезе тромботической тромбоцитопенической пурпуры, но и при сердечно-сосудистых заболеваниях. Расширение знаний о металлопротеазе

ADAMTS-13 может улучшить наше понимание патогенеза этих заболеваний, механизмов регуляции свертывающей системы крови в целом, а также предложить новые решения для улучшения результатов лечения.

Целью данного обзора является обобщение современной информации о структуре и функции металлопротеазы ADAMTS-13.

Металлопротеазы ADAMTS-13

Пионерские исследования, выполненные в 1996 г., обнаружили взаимодействующую с фактором Виллебранда плазменную протеазу. Было установлено, что функциональная активность данной протеазы зависит от ионов Zn^{2+} и Ca^{2+} , присутствие которых было необходимым для расщепления фактора Виллебранда при исследованиях *in vitro*. Было показано, что воздействие металлопротеазы приводит к расщеплению мультимеров фактора Виллебранда в специфическом сайте (Tyr1605-Met1606) в домене A2 и уменьшению гемостатической функции фактора Виллебранда *in vivo* [1, 2]. Металлопротеаза ADAMTS-13 была идентифицирована и клонирована в 2001 г. [3, 4].

Биологической функцией металлопротеазы ADAMTS-13 является расщепление сверхкрупных мультимеров фактора Виллебранда [5]. Фактор Виллебранда представляет собой большой и гетерогенный адгезивный гликопротеин — один из ключевых белков свертывающей системы крови [6]. Он синтезируется в эндотелиальных клетках и мегакариocyтах в виде мономера, подвергаясь дальнейшей димеризации в эндоплазматическом ретикулуме через С-концевую дисульфидную связь [7]. Мультимеризация происходит в аппарате Гольджи в результате образования пропептид-индуцированной дисульфидной связи [8]. Гетерогенный фактор Виллебранда и сверхкрупные мультимеры фактора Виллебранда депонируются в тельцах Вейбеля—Паладе, из которых они могут выделяться конститутивно и при необходимости [9]. Сверхкрупные мультимеры фактора Виллебранда потенциально тромбогенны, поскольку способны спонтанно взаимодействовать с тромбоцитами, образуя сгустки, блокирующие систему микроциркуляции [10].

Металлопротеаза ADAMTS-13 синтезируется в основном в печени. Концентрация ADAMTS-13 в плазме человека колеблется от 0,7 до 1,4 мкг/мл. Матричная РНК, кодирующая полноразмерный протеин ADAMTS-13 (примерно 4,3 kb), обнаруживается в печени с помощью нозерн-блоттинга [3, 4]. Усеченная форма матричной РНК ADAMTS-13 (примерно 2,4 kb) при использовании той же методики обнаруживается в других тканях, таких как плацента и скелетные мышцы [4]. Используя обратную полимеразную цепную реакцию, фрагменты матричной РНК ADAMTS-13 выявляются во многих тканях, включая почки, поджелудочную железу, селезенку, тимус, предстательную железу, яички, яичники, тонкую кишку, толстую кишку и лейкоциты периферической крови [3, 11]. В печени ADAMTS-13 локализуется в звездчатых клетках [12]. Содержание матричной РНК ADAMTS-13 и экспрессия белка ADAMTS-13 в звездчатых клетках крыс *in vitro* и *in vivo* резко повышается при механическом воздействии или под влиянием трансформирующего ростового фактора β [13], что ука-

зывает на возможную роль ADAMTS-13 в ремоделировании ткани печени после травмы. Кроме того, белок ADAMTS-13, продуцируемый в звездчатых клетках, может диффундировать в капилляры и поступать в кровоток, определяя тем самым плазменную активность ADAMTS-13. В пользу этого механизма свидетельствуют такие факты, как уменьшение плазменной активности ADAMTS-13 у людей после частичной гепатэктомии [14] или у крыс после введения диметилнитрозамина, повреждающего звездчатые клетки [15], и повышение активности ADAMTS-13 в звездчатых клетках и плазме в моделях холестаза и стеатогепатита у крыс [16]. Матричная РНК ADAMTS-13 и белок ADAMTS-13 также были обнаружены в эндотелиальных клетках сосудов как *in vitro*, так и *in vivo* [17, 18].

Показано [18], что нестимулированные эндотелиальные клетки вены пуповины человека продуцируют в культуре приблизительно 1 нг ADAMTS-13 на 1 мл кондиционированной среды каждые 60 минут. Количество ADAMTS-13 примерно в 100 раз меньше, чем количество фактора Виллебранда (100 нг/мл), производимого этими клетками в тех же условиях. При использовании иммуногистохимического метода было продемонстрировано, что ADAMTS-13 не накапливается совместно с фактором Виллебранда в тельцах Вейбеля—Паладе и, по-видимому, секретируется в циркуляцию непосредственно из места синтеза [17, 18].

Функция металлопротеазы ADAMTS-13, синтезированной в эндотелии, не вполне понятна. В то время как эндотелиальные клетки синтезируют следовые количества ADAMTS-13 в культуре, суммарная площадь эндотелиальной выстилки предполагает потенциально существенный вклад ADAMTS-13, имеющего эндотелиальное происхождение, в величину плазменной активности ADAMTS-13. Кроме того, металлопротеаза ADAMTS-13, высвобождаемая из эндотелиальных клеток, может расщеплять сверхкрупные мультимеры фактора Виллебранда, фиксированного на поверхности клеток, обеспечивая дополнительный механизм поддержания поверхности, свободной от фактора Виллебранда [18].

В зависимости от клеточного окружения металлопротеаза ADAMTS-13 может обладать как проангиогенным, так и антиангиогенным эффектом. В исследовании М. Lee и соавт. [19] были получены результаты, свидетельствующие о том, что, с одной стороны, обработка эндотелиальных клеток вены пуповины человека рекомбинантной ADAMTS-13 приводит к значительному образованию капиллярноподобных структур и клеточной миграции, что указывает на усиленный ангиогенез. С другой стороны, когда в культуральной среде присутствовал фактор роста эндотелия сосудов, металлопротеаза ADAMTS-13 ингибировала активность, индуцированную этим фактором. Этот

антиангиогенный эффект можно предотвратить предварительной инкубацией ADAMTS-13 с моноклональными антителами, направленными против С-концевого локуса TSP1 повторов 5–7 [19], что указывает на роль повторов TSP1 в опосредовании про- и антиангиогенных эффектов. Небольшое количество матричной РНК ADAMTS-13 обнаруживается в мегакариocyтах и тромбоцитах человека [20]. Биологическая функция ADAMTS-13, полученной из тромбоцитов, остается неизвестной. В исследовании M. Suzuki и соавт. [21] установлено, что трансгенная, сверхэкспрессированная ADAMTS-13 в тромбоцитах ADAMTS13^{-/-} мышей может высвобождаться после активации тромбином и коллагеном, а также при формировании тромба после повреждения 10 %-ным хлоридом железа. Секретируемая человеческая ADAMTS-13 способна замедлять процесс образования тромба в брыжеечных артериолах после окислительного повреждения и защищает ADAMTS13^{-/-} мышей от тромбогенного эффекта фактора Виллебранда и индуцированного Шига-токсином тромбообразования. Данные результаты свидетельствуют о том, что ADAMTS-13, синтезируемая в тромбоцитах, может иметь биологически важную функцию [21].

ADAMTS-13 имеет доменную структуру, включающую сигнальный пептид, пропептид, металлопротеазный домен, дисинтегрин-подобный домен, первый повтор тромбоспондина первого типа, богатый цистеином, и спейсерный домены. Более дистальный С-конец содержит семь дополнительных повторов тромбоспондина первого типа и два CUB-домена [5].

Основой для понимания функции металлопротеазы, расщепляющей фактор Виллебранда, стал установленный факт, что дефицит ее приводит к развитию тромботической тромбоцитопенической пурпуры [22]. За последние 15 лет была установлена функциональная роль большинства доменов ADAMTS-13, а также выяснена ключевая роль взаимодействия ADAMTS-13 и фактора Виллебранда в регуляции гемостаза [23].

Металлопротеазный домен ADAMTS-13 сам по себе не имеет или обладает малой протеолитической активностью в отношении фактора Виллебранда. Металлопротеазный и дисинтегрин-подобный домены, по-видимому, являются единой функциональной единицей [24–27]. Экспериментальные данные также свидетельствуют, что добавление дисинтегрин-подобного домена к металлопротеазному домену значительно увеличивает способность ADAMTS-13 расщеплять фактор Виллебранда [24, 26]. Металлопротеаза ADAMTS-13, лишенная дисинтегрин-подобного домена [24–26] или имеющая точечные мутации в варибельных областях дисинтегрин-подобного домена (Arg349Ala и Leu350Gly), обладает резко сниженной протеолитической активностью по отношению к пептиду и мультимеру фактора Виллебранда, что указывает на важность дисинтегрин-подобного домена в распознавании

субстрата. Остатки Arg349 и Leu350 дисинтегрин-подобного домена ADAMTS-13 могут взаимодействовать с остатками Asp1614 и Ala1612 в центральном домене A2 фактора Виллебранда. Такое взаимодействие, по-видимому, помогает позиционировать связь Tyr1605–Met1606 для расщепления, тем самым заметно влияя на константу скорости и каталитическую эффективность субстратного протеолиза [26].

Большое внимание уделяется значению богатого цистеином и спейсерного доменов ADAMTS-13 в распознавании специфического субстрата [24, 27]. Варианты ADAMTS-13, у которых отсутствуют как богатый цистеином, так и спейсерный домен или только спейсерный домен, практически не обладают активностью по отношению к связанному с клеткой сверхкрупным мультимером фактора Виллебранда и циркулирующему фактору Виллебранда [24].

Протеолитическое расщепление пептидного субстрата увеличивается благодаря взаимодействию некаталитических доменов с доменом A2 (между остатками Asp1614 и Arg1668) фактора Виллебранда [25, 26].

Протеазы семейства ADAMTS имеют переменное количество повторов тромбоспондина первого типа (Thrombospondin 1 — TSP1), которые могут играть роль в клеточной локализации и распознавании субстрата. Первый повтор TSP1 ADAMTS-13 связывается непосредственно с регионом, состоящим из 73 аминокислотных остатков от D1596 до R1668 фактора Виллебранда, обозначаемым как VWF73 [24]. Повторы 5–8 TSP1 протеазы ADAMTS-13 связываются с фактором Виллебранда через его домен D4 [28]. Показано, что С-концевые повторы TSP1 ADAMTS-13 взаимодействуют с поверхностным рецептором CD36 эндотелиальных клеток [29]. Такое взаимодействие может усиливать протеолитическое расщепление сверхкрупных мультимеров фактора Виллебранда в месте его высвобождения при воздействии силы, возникающих при движении (течении) крови (обозначается термином «воздействие силы сдвига жидкости») [30]. Повторы TSP1 ADAMTS-13 содержат свободные тиолы, которые могут реагировать со свободными тиолами на поверхности сверхкрупных мультимеров фактора Виллебранда или плазменного фактора Виллебранда, подвергнутого воздействию силы сдвига жидкости. Такое взаимодействие может препятствовать образованию дисульфидных связей между двумя мультимерами фактора Виллебранда в условиях высоких силы сдвига жидкости, ослабляя тем самым фактор Виллебранд-опосредованную адгезию и агрегацию тромбоцитов [5, 23]. С другой стороны, представлены данные о том, что у человека и мышей металлопротеаза ADAMTS-13, не содержащая С-концевых повторов 2–8 TSP1 и доменов CUB,

расщепляет связанные с клеткой сверхкрупные мультимеры фактора Виллебранда и плазменный фактор Виллебранда с такой же эффективностью, как и полноразмерный белок ADAMTS-13 [31, 32]. Для более точного понимания биологической роли повторов TSP1 металлопротеазы ADAMTS-13 необходимы дальнейшие исследования.

Домены CUB уникальны для ADAMTS-13 и не найдены в других металлопротеазах семейства ADAMTS и ADAM-протеазах [33]. Роль доменов CUB металлопротеазы ADAMTS-13 в полной мере неясна. Рекомбинантные CUB-1 и CUB-1+2 домены или синтетические пептиды, полученные из домена CUB-1 ADAMTS-13, частично блокируют протеолитическое расщепление сверхкрупных мультимеров фактора Виллебранда, связанного с эндотелиальными клетками в условиях воздействия силы сдвига жидкости. Это позволило предположить, что домены CUB ADAMTS-13 могут взаимодействовать с сверхкрупными мультимерами фактора Виллебранда, фиксированными на поверхности эндотелиальных клеток [34]. В пользу данной гипотезы свидетельствует тот факт, что молекула ADAMTS-13, у которой отсутствуют домены CUB, не способна к расщеплению сверхкрупных мультимеров фактора Виллебранда с фиксированными на нем тромбоцитами в брыжечных артериолах ADAMTS13^{-/-} мышей [35]. В то же время имеются сообщения о том, что ADAMTS-13 человека, лишенная доменов CUB, расщепляет свежие нити сверхкрупных мультимеров фактора Виллебранда в отсутствие силы сдвига жидкости [36] и нити сверхкрупных мультимеров фактора Виллебранда, декорированные тромбоцитами и фиксированные к культивируемым эндотелиальным клеткам пупочной вены человека в условиях потока [32]. Эти противоречивые результаты свидетельствуют о сложности оценки функции ADAMTS-13 в физиологических условиях.

Металлопротеаза ADAMTS-13 секретируется как конститутивная активная протеаза [18, 37]. В настоящее время ее ингибитор не обнаружен. Плазменный $\alpha 2$ -макрोगлобулин ингибирует многие другие матричные металлопротеазы, включая ADAMTS-4, -5, -7 и -12, но, по-видимому, не связывается и не влияет на активность ADAMTS-13 по отношению к фактору Виллебранда, что позволило высказать предположение о регуляции функции ADAMTS-13 на уровне субстрата [5]. Свежесинтезированные сверхкрупные мультимеры фактора Виллебранда, закрепленные на мембране эндотелиальных клеток, могут быть расщеплены ADAMTS-13 в присутствии [38] или в отсутствие действия силы сдвига жидкости [36]. Это указывает на то, что сверхкрупные мультимеры фактора Виллебранда, связанные с эндотелиальными клетками, находятся в открытой конформации [5]. После попадания в кровоток сверхкрупные мультимеры фактора Виллебранда быстро принимают закрытую

конформацию, которая становится очень устойчивой к протеолизу ADAMTS-13 при отсутствии действия силы сдвига жидкости или воздействия денатуратов. Плазменные ультракрупные мультимеры фактора Виллебранда восстанавливают свою чувствительность к ADAMTS-13 при воздействии силы сдвига жидкости (приблизительно 20–100 дин/см²), которое, как предполагают, разворачивает центральный домен A2 фактора Виллебранда. При этом взаимодействие между фактором Виллебранда и ADAMTS-13 при воздействии силы сдвига жидкости является высокоаффинным [39]. Такая сила сдвига жидкости встречается *in vivo* в суженных или разветвляющихся сосудах, артериях, артериолах и системе микроциркуляции. Сила сдвига жидкости возрастает по мере нарастания стеноза аорты, что приводит к увеличению протеолиза фактора Виллебранда под воздействием ADAMTS-13 [40, 41]. Хирургическая коррекция стеноза снижает скорость сдвига жидкости и тем самым уменьшает чувствительность фактора Виллебранда к воздействию металлопротеазы ADAMTS-13, что приводит к нормализации соотношения мультимеров фактора Виллебранда в плазме [5, 42].

Воздействие силы сдвига жидкости, характерное для артериального кровотока, может быть смоделировано *in vitro* с использованием конической пластины вискозиметра [43], мини-вortexа [28, 39] и микрожидкостной системы [44], генерирующих ламинарный поток. При воздействии силы сдвига жидкости в модели *in vitro* протеолитическое расщепление мультимерного фактора Виллебранда металлопротеазой ADAMTS-13 увеличивается по мере нарастания скорости сдвига жидкости [39]. Также в модели *in vitro* отмечено расщепление изолированного A1A2A3-тридомена фактора Виллебранда [45] и домена A2 фактора Виллебранда под воздействием силы сдвига жидкости [46]. Суммарно эти данные свидетельствуют о том, что сила сдвига жидкости играет решающую роль в регулировании протеолитического расщепления фактора Виллебранда металлопротеазой ADAMTS-13 [5].

Коагуляционный фактор VIII, который обладает высоким родством к фактору Виллебранда, может оказывать воздействие на доменные области A1A2A3 и регулировать протеолитическое расщепление A2 домена фактора Виллебранда металлопротеазой ADAMTS-13. Эффект усиления протеолиза фактора Виллебранда в присутствии фактора VIII был обнаружен только при воздействии силы сдвига жидкости. Это объясняется тем, что связывание фактора VIII с фактором Виллебранда может облегчать конформационное разворачивание домена A2 в при воздействии силы сдвига жидкости. При нормандском варианте (2N) болезни Виллебранда, характеризующемся тяжелым дефектом связывания фактора VIII с фактором Виллебранда, имеет место дефект расщепления фактора Виллебранда

протеазой ADAMTS-13 в присутствии фактора VIII. Имеющиеся наблюдения свидетельствуют о роли фактора VIII как физиологического кофактора, регулирующего расщепление фактора Виллебранда протеазой ADAMTS-13. Данная кофакторная активность зависит от взаимодействия между легкой цепью фактора VIII и доменов D'D3 фактора Виллебранда [5, 43].

Тромбоцитарный гликопротеин GPIb α обладает свойством связывать фактор Виллебранда. Исследования показали, что добавление фиксированных формалином, лиофилизированных или свежих тромбоцитов и растворимого GPIb α к мультимерному фактору Виллебранда увеличивает его протеолитическое расщепление металлопротеазой ADAMTS-13 вне зависимости от действия силы сдвига жидкости [43, 47]. Ристоцетин, антибиотик, который связывает домен A1 фактора Виллебранда рядом с сайтом, связывающим GPIb α , также улучшает расщепление мультимерного фактора Виллебранда металлопротеазой ADAMTS-13. Эти результаты свидетельствуют, что взаимодействие между тромбоцитарным GPIb α (или ристоцитином) и A1 доменом влияет на доступность A2 домена для действия ADAMTS-13. Ристоцетин уменьшает потребность в факторе VIII для расщепления фактора Виллебранда металлопротеазой ADAMTS-13. Связывание тромбоцитарного GPIb α с фактором Виллебранда усиливает кофакторный эффект фактора VIII [43]. Эти результаты свидетельствуют, что фактор VIII и тромбоцитарный гликопротеин GPIb α обладают синергическими эффектами для усиления расщепления фактора Виллебранда металлопротеазой ADAMTS-13 под воздействием силы сдвига жидкости [5].

Конформационная активация металлопротеазы ADAMTS-13 фактором Виллебранда является важным аспектом реализации ее функции. Пониманию функции ADAMTS-13 в значительной степени способствовало изучение усеченных мутантов, приготовленных из конструкций с постепенным удалением фрагментов, начиная с С-конца. Первоначально было установлено, что расщепление короткого субстрата VWF73 увеличивалось примерно в четыре раза при усечении полноразмерной металлопротеазы ADAMTS-13 (FL ADAMTS-13) до варианта MDTCS [25]. Это позволило предположить, что дистальные домены, содержащие повторы тромбоспондина и CUB-домены, могут ингибировать активность молекулы, что было подтверждено в дальнейших исследованиях [23].

При исследовании активности металлопротеазы ADAMTS-13 в зависимости от pH было обнаружено, что FL ADAMTS-13, но не MDTCS, обладает наибольшей активностью при pH 6. Кроме того, моноклональные антитела, направленные к С-концевым доменам ADAMTS-13, могут повысить ее активность только при pH 6. Это позволяет предположить ауто-

ингибиторную роль С-концевых доменов при физиологическом уровне pH. К тому же, помимо снижения pH и наличия активирующих моноклональных антител, аутоингибирование усиливается в присутствии домена D4 фактора Виллебранда [48]. Также при изучении аллостерических характеристик металлопротеазы ADAMTS-13 и ее усеченных вариантов было высказано предположение, что металлопротеаза ADAMTS-13 может находиться в компактной и расширенной конфигурации [48].

При анализе металлопротеазы ADAMTS-13 с усиленной функциональной активностью (GoF-ADAMTS-13) с вариантным спейсерным доменом, которая обладает повышенной протеолитической активностью по сравнению с металлопротеазой ADAMTS-13 дикого типа (WT-ADAMTS-13), было показано, что связывание фактора Виллебранда с WT-ADAMTS-13 приводило к разворачиванию и функциональной активации WT-ADAMTS-13 [49]. В исследовании K.South и соавт. [50] установлено, что GoF-ADAMTS-13 протеаза находится в предварительно активированном состоянии и не может быть дополнительно активирована фактором Виллебранда D4-CK. Также установлено прямое связывание между спейсерным доменом N-концевого фрагмента ADAMTS-13, MDTCS и CUB1–2 доменными фрагментами, в связи с чем этими исследователями было высказано предположение, что подобное взаимодействие поддерживает замкнутую конформацию ADAMTS-13 и нарушается в варианте GoF-ADAMTS-13. Ряд антигенных детерминант GoF-ADAMTS-13 устроены таким образом, что распознавались антителами, вызывающими приобретенную тромбоцитическую тромбоцитопеническую пурпuru (ТТП). По-видимому, эти антигенные детерминанты обычно маскируются связыванием CUB-доменов со спейсерным доменом у WT-ADAMTS-13 и обнаруживаются только при конформационной активации. Анализ методом электронной микроскопии подтвердил, что WT-ADAMTS-13 находится в компактной, глобулярной конформации, которая частично разворачивается в варианте GoF-ADAMTS-13 [50].

Активация ADAMTS-13 фактором Виллебранда D4-CK подчеркивает важную роль С-концевых доменов фактора Виллебранда в его протеолитической обработке. Был идентифицирован сайт связывания ADAMTS-13 в факторе Виллебранда D4-CK, локализованный главным образом в домене D4, который способствует сближению двух белков в отсутствие конформационной активации фактора Виллебранда [28]. Продемонстрирована обратимая ассоциация металлопротеазы ADAMTS-13 с фактором Виллебранда, находящимся в закрытой конформации [51]. Высказано предположение, что такое связывание этих белков обеспечивает успешное расщепление фактора Виллебранда при переходе его в открытую конформа-

цию под воздействием силы сдвига жидкости. В свете представленных данных, демонстрирующих конформационную активацию ADAMTS-13, реакцию связывания можно рассматривать также как побуждающую стадию активации протеазы ADAMTS-13 для подготовки ее экзосайтного взаимодействия с доменом A2 фактора Виллебранда, открывающимся при разворачивании фактора Виллебранда при воздействии сил сдвига [23].

Н.В. Feys и соавт. [51] высказали предположение, что в циркуляции только 3 % ADAMTS-13 связаны фактором Виллебранда в конформационно-активной форме. При тромботических и воспалительных состояниях, вследствие которых фактор Виллебранда высвобождается из телец Вейбеля—Палладе активированного эндотелия или фиксируется к обнаженному субэндотелию, доля конформационно-активной протеазы ADAMTS-13 может быть значительно выше.

При изучении конформационной активации металлопротеазы ADAMTS-13 была установлена гибкость дистальных доменов TSP2–CUB2, которые способствовали структурной трансформации, необходимой для изменения формы белка во время процесса активации от компактной к более вытянутой [52].

Идиопатическая ТТП у взрослых обусловлена главным образом тяжелым дефицитом активности ADAMTS-13 вследствие воздействия на нее антител класса IgG. Ингибирующие антитела обнаруживаются у 44–100 % больных приобретенной ТТП с тяжелым дефицитом активности плазменной ADAMTS-13 [53]. При использовании высокочувствительных методов исследования, такой как иммуноферментный анализ [53], или проточной цитометрии [54] анти-ADAMTS-13 антитела класса IgG выявляются у всех больных ТТП, у которых имеется выраженный дефицит активности плазменной ADAMTS-13 [53]. Картирование и профилирование антител показало, что у больных ТТП в плазме преобладают анти-ADAMTS-13 подклассов IgG1 и IgG4 [55] и почти все анти-ADAMTS-13 класса IgG связываются с богатым цистеином и спейсерным доменами, особенно со спейсерным доменом [56–58]. Другие домены ADAMTS-13, включая пропептид, металлопротеазный, дезинтегриновый, первый повтор TSP1, более дистальные повторы TSP1 и домены CUB, менее реакционноспособны с аутоантителами [56, 58]. Дальнейший анализ позволил установить, что основные антигенные эпитопы локализованы в остатках Tyr572–Asn579 [59], Val657–Gly666 [57, 59] и Gly662–Val687 [60]. У 90 % больных ТТП отмечается потеря чувствительности к аутоантителам анти-ADAMTS-13 после замещения в структуре экзосайтного 3-спейсерного домена остатков Arg568, Phe592, Arg660, Tyr661 и Tyr665 [58]. Эти остатки играют критическую роль в распознавании субстрата и протеолизе фактора Виллебранда [57, 61]. Следовательно, можно предположить, что фиксация аутоантител анти-ADAMTS-13 в этом регионе блокирует

связывание металлопротеазы с фактором Виллебранда и нарушает ее протеолитическую функцию.

Механизм выработки аутоантител против металлопротеазы ADAMTS-13 неизвестен и требует дальнейшего изучения. Преобладание среди больных женщин [56] и изучение аутоантител анти-ADAMTS-13 у сестер-близнецов [62] позволяют предположить наличие генетической предрасположенности [5]. Выявлена повышенная частота встречаемости аллеля HLA-DRB1*11 у больных с приобретенной ТТП, что согласуется с данной гипотезой [63].

Маскировка скрытых (криптических) эпитопов в замкнутой конформации ADAMTS-13 может предотвратить образование аутоантител. Компактная структура плазменной ADAMTS-13 может объяснить низкую иммуногенность ADAMTS-13, вводимой со свежемороженой плазмой, для восполнения дефицита этой металлопротеазы больным врожденной формой ТТП. Конформационные изменения, приводящие к открытию криптических эпитопов, лежат в основе продукции антител. Повышенное содержание фактора Виллебранда в плазме во время беременности или инфекции, которые являются клиническими триггерами приобретенной ТТП, может привести к субстрат-индуцированной активации ADAMTS-13 с последующим иммуногенным эффектом. Было продемонстрировано, что CD4⁺-Т-клетки у больных приобретенной ТТП были реактогенны по отношению к пептидам домена CUB2 металлопротеазы ADAMTS-13 [64]. В другом исследовании [52] были идентифицированы многочисленные антитела, нацеленные на С-концевые домены металлопротеазы ADAMTS-13, которые повышают ее активность до уровня, указывающего на конформационную активацию. Высказано предположение [65], что раннее антигенное распознавание ADAMTS-13 происходит через поверхностные обнаженные эпитопы в С-концевых доменах. Потенциальный активирующий эффект этих антител может привести к дальнейшему контакту с эпитопами N-концевого домена и наработке ингибирующей популяции аутоантител. Подобный сценарий с выработкой анти-ADAMTS-13 IgG-аутоантител может реализовываться у здоровых людей, и появление низкоаффинных, неингибирующих антител, некоторые из которых были нацелены на С-концевые домены металлопротеазы ADAMTS-13, может предшествовать процессу гипермутации В-клеток памяти, необходимой для генерации высокоаффинных антител.

Сегодня изучению структуры и функциональной роли металлопротеазы ADAMTS-13 как одного из ключевых белков-регуляторов свертывающей системы крови уделяется значительное внимание различными исследовательскими группами, и следует ожидать в ближайшее время появления новой информации, расширяющей представления не только о данном белке, но и о системе гемостаза в целом.

Литература

1. Furlan M., Robles R., Lammle B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by *in vivo* proteolysis. *Blood*. 1996; 87: 4223–34.
2. Tsai H.M. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood*. 1996; 87: 4235–44.
3. Levy G.G., Nichols W.C., Lian E.C. et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*. 2001; 413: 488–94. DOI: 10.1038/35097008
4. Zheng X.L., Chung D., Takayama T., Majerus E. et al. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 41059–63. DOI: 10.1074/jbc.C100515200
5. Zheng X.L. Structure-function and regulation of ADAMTS-13 protease. *J. Thromb Haemost.* 2013; 11(Suppl. 1): 11–23. DOI: 10.1111/jth.12221
6. Чернова Е.В. Фактор Виллебранда. Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. 2018; 10(4): 73–80. DOI: 10.17816/mechnikov201810473-80
7. Marti T., Rosselet S.J., Titani K., Walsh K.A. Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry*. 1987; 26: 8099–109. DOI: 10.1021/bi00399a013
8. Wise R.J., Pittman D.D., Handin R.I. et al. The propeptide of von Willebrand factor independently mediates the assembly of von Willebrand multimers. *Cell*. 1988; 52: 229–36.
9. Wagner D.D., Saffaripour S., Bonfanti R. et al. Induction of specific storage organelles by von Willebrand factor propeptide. *Cell*. 1991; 64: 403–13.
10. Moake J.L., Rudy C.K., Troll J.H. et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* 1982; 307: 1432–5.
11. Plaimauer B., Zimmermann K., Volkel D. et al. Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood*. 2002; 100: 3626–32. DOI: 10.1182/blood-2002-05-1397
12. Uemura M., Tatsumi K., Matsumoto M. et al. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood*. 2005; 106: 922–4. DOI: 10.1182/blood-2005-01-0152
13. Niiya M., Uemura M., Zheng X.W. et al. Increased ADAMTS13 proteolytic activity in rat hepatic stellate cells upon activation *in vitro* and *in vivo*. *J. Thromb Haemost.* 2006; 4:1063–70. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.01893.x
14. Okano E., Ko S., Kanehiro H., Matsumoto M. et al. ADAMTS13 activity decreases after hepatectomy, reflecting a postoperative liver dysfunction. *Hepato-gastroenterology*. 2010; 57: 316–20.
15. Kume Y., Ikeda H., Inoue M. et al. Hepatic stellate cell damage may lead to decreased plasma ADAMTS13 activity in rats. *FEBS Lett.* 2007; 58: 1631–4. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.03.029
16. Watanabe N., Ikeda H., Kume Y. et al. Increased production of ADAMTS13 in hepatic stellate cells contributes to enhanced plasma ADAMTS13 activity in rat models of cholestasis and steatohepatitis. *Thromb Haemost.* 2009; 102: 389–96. DOI: 10.1160/TH08-11-0732
17. Turner N., Nolasco L., Tao Z. Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *J Thromb Haemost.* 2006; 4: 1396–404. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.01959.x
18. Turner N.A., Nolasco L., Ruggeri Z.M., Moake J.L. Endothelial cell ADAMTS-13 and VWF: production, release, and VWF string cleavage. *Blood*. 2009; 114: 5102–11. DOI: 10.1182/blood-2009-07-231597

References

1. Furlan M., Robles R., Lammle B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by *in vivo* proteolysis. *Blood*. 1996; 87: 4223–34.
2. Tsai H.M. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood*. 1996; 87: 4235–44.
3. Levy G.G., Nichols W.C., Lian E.C. et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*. 2001; 413: 488–94. DOI: 10.1038/35097008
4. Zheng X.L., Chung D., Takayama T., Majerus E. et al. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 41059–63. DOI: 10.1074/jbc.C100515200
5. Zheng X.L. Structure-function and regulation of ADAMTS-13 protease. *J. Thromb Haemost.* 2013; 11(Suppl. 1): 11–23. DOI: 10.1111/jth.12221
6. Chernova E.V. Von Willebrand factor. Herald of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov. 2018; 10(4): 73–80. DOI: 10.17816/mechnikov201810473-80 (in Russian).
7. Marti T., Rosselet S.J., Titani K., Walsh K.A. Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry*. 1987; 26: 8099–109. DOI: 10.1021/bi00399a013
8. Wise R.J., Pittman D.D., Handin R.I. et al. The propeptide of von Willebrand factor independently mediates the assembly of von Willebrand multimers. *Cell*. 1988; 52: 229–36.
9. Wagner D.D., Saffaripour S., Bonfanti R. et al. Induction of specific storage organelles by von Willebrand factor propeptide. *Cell*. 1991; 64: 403–13.
10. Moake J.L., Rudy C.K., Troll J.H. et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* 1982; 307: 1432–5.
11. Plaimauer B., Zimmermann K., Volkel D. et al. Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood*. 2002; 100: 3626–32. DOI: 10.1182/blood-2002-05-1397
12. Uemura M., Tatsumi K., Matsumoto M. et al. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood*. 2005; 106: 922–4. DOI: 10.1182/blood-2005-01-0152
13. Niiya M., Uemura M., Zheng X.W. et al. Increased ADAMTS13 proteolytic activity in rat hepatic stellate cells upon activation *in vitro* and *in vivo*. *J. Thromb Haemost.* 2006; 4:1063–70. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.01893.x
14. Okano E., Ko S., Kanehiro H., Matsumoto M. et al. ADAMTS13 activity decreases after hepatectomy, reflecting a postoperative liver dysfunction. *Hepato-gastroenterology*. 2010; 57: 316–20.
15. Kume Y., Ikeda H., Inoue M. et al. Hepatic stellate cell damage may lead to decreased plasma ADAMTS13 activity in rats. *FEBS Lett.* 2007; 58: 1631–4. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.03.029
16. Watanabe N., Ikeda H., Kume Y. et al. Increased production of ADAMTS13 in hepatic stellate cells contributes to enhanced plasma ADAMTS13 activity in rat models of cholestasis and steatohepatitis. *Thromb Haemost.* 2009; 102: 389–96. DOI: 10.1160/TH08-11-0732
17. Turner N., Nolasco L., Tao Z. Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *J Thromb Haemost.* 2006; 4: 1396–404. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.01959.x
18. Turner N.A., Nolasco L., Ruggeri Z.M., Moake J.L. Endothelial cell ADAMTS-13 and VWF: production, release, and VWF string cleavage. *Blood*. 2009; 114: 5102–11. DOI: 10.1182/blood-2009-07-231597

19. Lee M., Rodansky E.S., Smith J.K., Rodgers G.M. ADAMTS13 promotes angiogenesis and modulates VEGF-induced angiogenesis. *Microvasc Res.* 2012; 84: 109–15. DOI: 10.1016/j.mvr.2012.05.004
20. Liu L., Choi H., Bernardo A. et al. Platelet-derived VWF-cleaving metalloprotease ADAMTS-13. *J. Thromb Haemost.* 2005; 3: 2536–44. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01561.x
21. Suzuki M., Murata M., Matsubara Y. et al. Detection of von Willebrand factor-cleaving protease [ADAMTS-13] in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 313: 212–16. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.11.111
22. Gardner M.D., Chion C.K., de Groot R. et al. A functional calcium-binding site in the metalloprotease domain of ADAMTS13. *Blood.* 2009; 113: 1149–57. DOI: 10.1182/blood-2008-03-144683
23. South K., Lane D.A. ADAMTS-13 and von Willebrand factor: a dynamic duo. *J. Thromb Haemost.* 2018; 16: 6–18. DOI: 10.1111/jth.13898
24. Ai J., Smith P., Wang S. et al. The proximal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 determine substrate specificity and are all required for cleavage of von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 29428–34. DOI: 10.1074/jbc.M505513200
25. Gao W., Anderson P.J., Sadler J.E. Extensive contacts between ADAMTS13 exosites and von Willebrand factor domain A2 contribute to substrate specificity. *Blood.* 2008; 112: 1713–9. DOI: 10.1182/blood-2008-04-148759
26. de Groot R., Bardhan A., Ramroop N. et al. Essential role of the disintegrin-like domain in ADAMTS13 function. *Blood.* 2009; 113: 5609–16. DOI: 10.1182/blood-2008-11-187914
27. Gao W., Anderson P.J., Majerus E.M. et al. Exosite interactions contribute to tension-induced cleavage of von Willebrand factor by the antithrombotic ADAMTS13 metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103: 19099–104. DOI: 10.1073/pnas.0607264104
28. Zanardelli S., Chion A.C., Groot E. et al. A novel binding site for ADAMTS13 constitutively exposed on the surface of globular VWF. *Blood.* 2009; 114: 2819–28. DOI: 10.1182/blood-2009-05-224915
29. Asch A.S., Tepler J., Silbiger S., Nachman R.L. Cellular attachment to thrombospondin. Cooperative interactions between receptor systems. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 1740–5.
30. Vomund A.N., Majerus E.M. ADAMTS13 bound to endothelial cells exhibits enhanced cleavage of von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 2009; 284: 30925–32. DOI: 10.1074/jbc.M109.000927
31. Yeh H.C., Zhou Z., Choi H. et al. Disulfide bond reduction of von Willebrand factor by ADAMTS-13. *J. Thromb Haemost.* 2010; 8: 2778–88. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.04094.x
32. Tao Z., Wang Y., Choi H. et al. Cleavage of ultralarge multimers of von Willebrand factor by C-terminal-truncated mutants of ADAMTS-13 under flow. *Blood.* 2005; 106: 141–3. DOI: 10.1182/blood-2004-11-4188
33. Tang B.L. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2001; 33: 33–44.
34. Tao Z., Peng Y., Nolasco L. et al. Recombinant CUB-1 domain polypeptide inhibits the cleavage of ULVWF strings by ADAMTS13 under flow conditions. *Blood.* 2005; 106: 4139–45. DOI: 10.1182/blood-2005-05-2029
35. de Maeyer B., de Meyer S.F., Feys H.B. et al. The distal carboxyterminal domains of murine ADAMTS13 influence proteolysis of platelet-decorated VWF strings in vivo. *J. Thromb Haemost.* 2010; 8: 2305–12. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.04008.x
36. Xiao J., Jin S.Y., Xue J. et al. Essential domains of a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats-13 metalloprotease required for modulation of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* 2011; 31: 2261–9. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.229609
19. Lee M., Rodansky E.S., Smith J.K., Rodgers G.M. ADAMTS13 promotes angiogenesis and modulates VEGF-induced angiogenesis. *Microvasc Res.* 2012; 84: 109–15. DOI: 10.1016/j.mvr.2012.05.004
20. Liu L., Choi H., Bernardo A. et al. Platelet-derived VWF-cleaving metalloprotease ADAMTS-13. *J. Thromb Haemost.* 2005; 3: 2536–44. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01561.x
21. Suzuki M., Murata M., Matsubara Y. et al. Detection of von Willebrand factor-cleaving protease [ADAMTS-13] in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 313: 212–16. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.11.111
22. Gardner M.D., Chion C.K., de Groot R. et al. A functional calcium-binding site in the metalloprotease domain of ADAMTS13. *Blood.* 2009; 113: 1149–57. DOI: 10.1182/blood-2008-03-144683
23. South K., Lane D.A. ADAMTS-13 and von Willebrand factor: a dynamic duo. *J. Thromb Haemost.* 2018; 16: 6–18. DOI: 10.1111/jth.13898
24. Ai J., Smith P., Wang S. et al. The proximal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 determine substrate specificity and are all required for cleavage of von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 29428–34. DOI: 10.1074/jbc.M505513200
25. Gao W., Anderson P.J., Sadler J.E. Extensive contacts between ADAMTS13 exosites and von Willebrand factor domain A2 contribute to substrate specificity. *Blood.* 2008; 112: 1713–9. DOI: 10.1182/blood-2008-04-148759
26. de Groot R., Bardhan A., Ramroop N. et al. Essential role of the disintegrin-like domain in ADAMTS13 function. *Blood.* 2009; 113: 5609–16. DOI: 10.1182/blood-2008-11-187914
27. Gao W., Anderson P.J., Majerus E.M. et al. Exosite interactions contribute to tension-induced cleavage of von Willebrand factor by the antithrombotic ADAMTS13 metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103: 19099–104. DOI: 10.1073/pnas.0607264104
28. Zanardelli S., Chion A.C., Groot E. et al. A novel binding site for ADAMTS13 constitutively exposed on the surface of globular VWF. *Blood.* 2009; 114: 2819–28. DOI: 10.1182/blood-2009-05-224915
29. Asch A.S., Tepler J., Silbiger S., Nachman R.L. Cellular attachment to thrombospondin. Cooperative interactions between receptor systems. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 1740–5.
30. Vomund A.N., Majerus E.M. ADAMTS13 bound to endothelial cells exhibits enhanced cleavage of von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 2009; 284: 30925–32. DOI: 10.1074/jbc.M109.000927
31. Yeh H.C., Zhou Z., Choi H. et al. Disulfide bond reduction of von Willebrand factor by ADAMTS-13. *J. Thromb Haemost.* 2010; 8: 2778–88. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.04094.x
32. Tao Z., Wang Y., Choi H. et al. Cleavage of ultralarge multimers of von Willebrand factor by C-terminal-truncated mutants of ADAMTS-13 under flow. *Blood.* 2005; 106: 141–3. DOI: 10.1182/blood-2004-11-4188
33. Tang B.L. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2001; 33: 33–44.
34. Tao Z., Peng Y., Nolasco L. et al. Recombinant CUB-1 domain polypeptide inhibits the cleavage of ULVWF strings by ADAMTS13 under flow conditions. *Blood.* 2005; 106: 4139–45. DOI: 10.1182/blood-2005-05-2029
35. de Maeyer B., de Meyer S.F., Feys H.B. et al. The distal carboxyterminal domains of murine ADAMTS13 influence proteolysis of platelet-decorated VWF strings in vivo. *J. Thromb Haemost.* 2010; 8: 2305–12. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.04008.x
36. Xiao J., Jin S.Y., Xue J. et al. Essential domains of a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats-13 metalloprotease required for modulation of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* 2011; 31: 2261–9. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.229609

37. Zhou W., Inada M., Lee T.P. et al. ADAMTS13 is expressed in hepatic stellate cells. *Lab Invest.* 2005; 85: 780–8. DOI: 10.1038/labinvest.3700275
38. Dong J.F. Cleavage of ultra-large von Willebrand factor by ADAMTS-13 under flow conditions. *J. Thromb Haemost.* 2005; 3: 1710–6. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01360.x
39. Zhang P., Pan W., Rux A.H. et al. The cooperative activity between the carboxyl-terminal TSP-1 repeats and the CUB domains of ADAMTS13 is crucial for recognition of von Willebrand factor under flow. *Blood.* 2007; 110: 1887–94. DOI: 10.1182/blood-2007-04-083329
40. Pareti F.I., Lattuada A., Bressi C. et al. Proteolysis of von Willebrand factor and shear stress-induced platelet aggregation in patients with aortic valve stenosis. *Circulation.* 2000; 102: 1290–5.
41. Blackshear J.L., Wysokinska E.M., Safford R.E. et al. Indexes of von Willebrand Factor as Biomarkers of Aortic Stenosis Severity (from the Biomarkers of Aortic Stenosis Severity [BASS] Study). *Am. J. Cardiol.* 2013; 111: 374–81. DOI: 10.1016/j.amjcard.2012.10.015
42. Yoshida K., Tobe S., Kawata M. Acquired von Willebrand disease type IIA in patients with aortic valve stenosis. *Ann. Thorac. Surg.* 2006; 81: 1114–6. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2005.01.023
43. Skipwith C.G., Cao W., Zheng X.L. Factor VIII and platelets synergistically accelerate cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13 under fluid shear stress. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 28596–603. DOI: 10.1074/jbc.M110.131227
44. Li M., Ku D.N., Forest C.R. Microfluidic system for simultaneous optical measurement of platelet aggregation at multiple shear rates in whole blood. *Lab. Chip.* 2012; 12: 1355–62. DOI: 10.1039/c2lc21145a
45. Wu T., Lin J., Cruz M.A. et al. Force-induced cleavage of single VWFA1A2A3 tridomains by ADAMTS-13. *Blood.* 2010; 115: 370–8. DOI: 10.1182/blood-2009-03-210369
46. Zhang Q., Zhou Y.F., Zhang C.Z. et al. Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106: 9226–31. DOI: 10.1073/pnas.0903679106
47. Nishio K., Anderson P.J., Zheng X.L., Sadler J.E. Binding of platelet glycoprotein Ibalph to von Willebrand factor domain A1 stimulates the cleavage of the adjacent domain A2 by ADAMTS13. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 10578–83. DOI: 10.1073/pnas.0402041101
48. Muia J., Zhu J., Gupta G. et al. Allosteric activation of ADAMTS13 by von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111: 18584–9. DOI: 10.1073/pnas.1413282112
49. Jian C., Xiao J., Gong L. et al. Gain-of-function ADAMTS13 variants that are resistant to autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2012; 119: 3836–43. DOI: 10.1182/blood-2011-12-399501
50. South K., Luken B.M., Crawley J.T. et al. Conformational activation of ADAMTS13. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111: 18578–83. DOI: 10.1073/pnas.1411979112
51. Feys H.B., Anderson P.J., Vanhoorelbeke K. et al. Multi-step binding of ADAMTS-13 to von Willebrand factor. *J Thromb Haemost.* 2009; 7: 2088–95. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03620.x
52. Deforche L., Roose E., Vandenbulcke A. et al. Linker regions and flexibility around the metalloprotease domain account for conformational activation of ADAMTS-13. *J. Thromb Haemost.* 2015; 13: 2063–75. DOI: 10.1111/jth.1314
53. Tsai H.M., Raoufi M., Zhou W. et al. ADAMTS13-binding IgG are present in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb Haemost.* 2006; 95: 886–92.
54. Li D., Xiao J., Paessler M., Zheng X.L. Novel recombinant glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored ADAMTS13 and variants for assessment of anti-AD-
37. Zhou W., Inada M., Lee T.P. et al. ADAMTS13 is expressed in hepatic stellate cells. *Lab Invest.* 2005; 85: 780–8. DOI: 10.1038/labinvest.3700275
38. Dong J.F. Cleavage of ultra-large von Willebrand factor by ADAMTS-13 under flow conditions. *J. Thromb Haemost.* 2005; 3: 1710–6. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01360.x
39. Zhang P., Pan W., Rux A.H. et al. The cooperative activity between the carboxyl-terminal TSP-1 repeats and the CUB domains of ADAMTS13 is crucial for recognition of von Willebrand factor under flow. *Blood.* 2007; 110: 1887–94. DOI: 10.1182/blood-2007-04-083329
40. Pareti F.I., Lattuada A., Bressi C. et al. Proteolysis of von Willebrand factor and shear stress-induced platelet aggregation in patients with aortic valve stenosis. *Circulation.* 2000; 102: 1290–5.
41. Blackshear J.L., Wysokinska E.M., Safford R.E. et al. Indexes of von Willebrand Factor as Biomarkers of Aortic Stenosis Severity (from the Biomarkers of Aortic Stenosis Severity [BASS] Study). *Am. J. Cardiol.* 2013; 111: 374–81. DOI: 10.1016/j.amjcard.2012.10.015
42. Yoshida K., Tobe S., Kawata M. Acquired von Willebrand disease type IIA in patients with aortic valve stenosis. *Ann. Thorac. Surg.* 2006; 81: 1114–6. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2005.01.023
43. Skipwith C.G., Cao W., Zheng X.L. Factor VIII and platelets synergistically accelerate cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13 under fluid shear stress. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 28596–603. DOI: 10.1074/jbc.M110.131227
44. Li M., Ku D.N., Forest C.R. Microfluidic system for simultaneous optical measurement of platelet aggregation at multiple shear rates in whole blood. *Lab. Chip.* 2012; 12: 1355–62. DOI: 10.1039/c2lc21145a
45. Wu T., Lin J., Cruz M.A. et al. Force-induced cleavage of single VWFA1A2A3 tridomains by ADAMTS-13. *Blood.* 2010; 115: 370–8. DOI: 10.1182/blood-2009-03-210369
46. Zhang Q., Zhou Y.F., Zhang C.Z. et al. Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106: 9226–31. DOI: 10.1073/pnas.0903679106
47. Nishio K., Anderson P.J., Zheng X.L., Sadler J.E. Binding of platelet glycoprotein Ibalph to von Willebrand factor domain A1 stimulates the cleavage of the adjacent domain A2 by ADAMTS13. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 10578–83. DOI: 10.1073/pnas.0402041101
48. Muia J., Zhu J., Gupta G. et al. Allosteric activation of ADAMTS13 by von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111: 18584–9. DOI: 10.1073/pnas.1413282112
49. Jian C., Xiao J., Gong L. et al. Gain-of-function ADAMTS13 variants that are resistant to autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2012; 119: 3836–43. DOI: 10.1182/blood-2011-12-399501
50. South K., Luken B.M., Crawley J.T. et al. Conformational activation of ADAMTS13. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111: 18578–83. DOI: 10.1073/pnas.1411979112
51. Feys H.B., Anderson P.J., Vanhoorelbeke K. et al. Multi-step binding of ADAMTS-13 to von Willebrand factor. *J Thromb Haemost.* 2009; 7: 2088–95. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03620.x
52. Deforche L., Roose E., Vandenbulcke A. et al. Linker regions and flexibility around the metalloprotease domain account for conformational activation of ADAMTS-13. *J. Thromb Haemost.* 2015; 13: 2063–75. DOI: 10.1111/jth.1314
53. Tsai H.M., Raoufi M., Zhou W. et al. ADAMTS13-binding IgG are present in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb Haemost.* 2006; 95: 886–92.
54. Li D., Xiao J., Paessler M., Zheng X.L. Novel recombinant glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored ADAMTS13 and variants for assessment of anti-AD-

- AMTS13 autoantibodies in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb Haemost.* 2011; 106: 947–58. DOI: 10.1160/TH11-05-0337
55. Ferrari S., Mudde G.C., Rieger M. et al. IgG subclass distribution of anti-ADAMTS13 antibodies in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb Haemost.* 2009; 7: 1703–10. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03568.x
56. Zheng X.L., Wu H.M., Shang D. et al. Multiple domains of ADAMTS13 are targeted by autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica.* 2010; 95: 1555–62. DOI: 10.3324/haematol.2009.019299
57. Pos W., Crawley J.T., Fijnheer R. et al. An autoantibody epitope comprising residues R660, Y661, and Y665 in the ADAMTS13 spacer domain identifies a binding site for the A2 domain of VWF. *Blood.* 2010; 115: 1640–9. DOI: 10.1182/blood-2009-06-229203
58. Pos W., Sorvillo N., Fijnheer R. et al. Residues Arg568 and Phe592 contribute to an antigenic surface for anti-ADAMTS13 antibodies in the spacer domain. *Haematologica.* 2011; 96: 1670–7. DOI: 10.3324/haematol.2010.036327
59. Luken B.M., Turenhout E.A., Kaijen P.H. et al. Amino acid regions 572–579 and 657–666 of the spacer domain of ADAMTS13 provide a common antigenic core required for binding of antibodies in patients with acquired TTP. *J. Thromb Haemost.* 2006; 96: 295–301. DOI: 10.1160/TH06-03-0135
60. Yamaguchi Y., Moriki T., Igari A. et al. Epitope analysis of autoantibodies to ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res.* 2011; 128: 169–73. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.03.010
61. Jin S.Y., Skipwith C.G., Zheng X.L. Amino acid residues Arg (659), Arg(660), and Tyr(661) in the spacer domain of ADAMTS13 are critical for cleavage of von Willebrand factor. *Blood.* 2010; 115: 2300–10. DOI: 10.1182/blood-2009-07-235101
62. Studt J.D., Kremer Hovinga J.A. et al. Familial acquired thrombotic thrombocytopenic purpura: ADAMTS-13 inhibitory autoantibodies in identical twins. *Blood.* 2004; 103: 4195–7. DOI: 10.1182/blood-2003-11-3888
63. Scully M., Brown J., Patel R. et al. Human leukocyte antigen association in idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: evidence for an immunogenetic link. *J. Thromb Haemost.* 2010; 8: 257–62. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03692.x
64. Verbiij F.C., Turksma A.W., de Heij F. et al. CD4+ T cells from patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura recognize CUB2 domain-derived peptides. *Blood.* 2016; 127: 1606–9. DOI: 10.1182/blood-2015-10-668053
65. Grillberger R., Casina V.C., Turecek P.L. et al. Anti-ADAMTS13 IgG autoantibodies present in healthy individuals share linear epitopes with those in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica.* 2014; 99: e58–60. DOI: 10.3324/haematol.2013.100685
- AMTS13 autoantibodies in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb Haemost.* 2011; 106: 947–58. DOI: 10.1160/TH11-05-0337
55. Ferrari S., Mudde G.C., Rieger M. et al. IgG subclass distribution of anti-ADAMTS13 antibodies in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb Haemost.* 2009; 7: 1703–10. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03568.x
56. Zheng X.L., Wu H.M., Shang D. et al. Multiple domains of ADAMTS13 are targeted by autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica.* 2010; 95: 1555–62. DOI: 10.3324/haematol.2009.019299
57. Pos W., Crawley J.T., Fijnheer R. et al. An autoantibody epitope comprising residues R660, Y661, and Y665 in the ADAMTS13 spacer domain identifies a binding site for the A2 domain of VWF. *Blood.* 2010; 115: 1640–9. DOI: 10.1182/blood-2009-06-229203
58. Pos W., Sorvillo N., Fijnheer R. et al. Residues Arg568 and Phe592 contribute to an antigenic surface for anti-ADAMTS13 antibodies in the spacer domain. *Haematologica.* 2011; 96: 1670–7. DOI: 10.3324/haematol.2010.036327
59. Luken B.M., Turenhout E.A., Kaijen P.H. et al. Amino acid regions 572–579 and 657–666 of the spacer domain of ADAMTS13 provide a common antigenic core required for binding of antibodies in patients with acquired TTP. *J. Thromb Haemost.* 2006; 96: 295–301. DOI: 10.1160/TH06-03-0135
60. Yamaguchi Y., Moriki T., Igari A. et al. Epitope analysis of autoantibodies to ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res.* 2011; 128: 169–73. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.03.010
61. Jin S.Y., Skipwith C.G., Zheng X.L. Amino acid residues Arg (659), Arg(660), and Tyr(661) in the spacer domain of ADAMTS13 are critical for cleavage of von Willebrand factor. *Blood.* 2010; 115: 2300–10. DOI: 10.1182/blood-2009-07-235101
62. Studt J.D., Kremer Hovinga J.A. et al. Familial acquired thrombotic thrombocytopenic purpura: ADAMTS-13 inhibitory autoantibodies in identical twins. *Blood.* 2004; 103: 4195–7. DOI: 10.1182/blood-2003-11-3888
63. Scully M., Brown J., Patel R. et al. Human leukocyte antigen association in idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: evidence for an immunogenetic link. *J. Thromb Haemost.* 2010; 8: 257–62. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03692.x
64. Verbiij F.C., Turksma A.W., de Heij F. et al. CD4+ T cells from patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura recognize CUB2 domain-derived peptides. *Blood.* 2016; 127: 1606–9. DOI: 10.1182/blood-2015-10-668053
65. Grillberger R., Casina V.C., Turecek P.L. et al. Anti-ADAMTS13 IgG autoantibodies present in healthy individuals share linear epitopes with those in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica.* 2014; 99: e58–60. DOI: 10.3324/haematol.2013.100685

Информация об авторах

Колосков Андрей Викторович*, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гематологии и трансфузиологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: Andrei.Koloskov@szgmu.ru, тел.: +7 (812) 948-09-17; 191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5249-4255>

Information about the authors

Andrey V. Koloskov*, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department for Hematology and Transfusiology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, e-mail: Andrei.Koloskov@szgmu.ru, tel.: +7 (812) 948-09-17; 191015, St. Petersburg, Kirochnaya str., 41. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5249-4255>

Мангушло Александр Александрович, аспирант кафедры гематологии и трансфузиологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: sutura@mail.ru, тел.: +7 (812) 948-09-17;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3163-5194>

*** Автор, ответственный за переписку**

Поступила: 24.07.2019

Принята к печати: 12.09.2019

Alexander A. Mangushlo, Postgraduate Researcher, Department for Hematology and Transfusiology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
e-mail: sutura@mail.ru, tel.: +7 (812) 948-09-17;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3163-5194>

*** Corresponding author**

Received 24 Jul 2019

Accepted 12 Sep 2019