

MICHAŁ B. PONCZEK

*Katedra Biochemii Ogólnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
Banacha 12/16, 90-237 Łódź
E-mail: mponczek@biol.uni.lodz.pl*

EWOLUCJA UKŁADU HEMOSTAZY KRĘGOWCÓW

WPROWADZENIE

Układ hemostazy odpowiada u kręgowców za delikatną równowagę pomiędzy krzepnięciem krwi z jednej strony, a rozpuszczaniem zakrzepów z drugiej. Wiele z białek zaangażowanych w ten system należy do rodziny proteaz serynowych – enzymów przecinających wiązania peptydowe w innych białkach, których aktywność zależy od obecności w centrum aktywnym trzech blisko położonych przestrzennie reszt aminokwasów – seryny, histydyny i asparaginy – zwanych triadą katalityczną. Proteazy układu hemostazy nie przeprowadzają całkowitego trawienia, ale jedynie niewielkie modyfikacje innych białek, zwykle następnym zymogenów proteaz serynowych, które w ten sposób zostają aktywowane. Aktywne enzymy działają na kolejne zymogeny, w skutek czego powstaje złożona sieć przekazywania i wzmacniania sygnału. Niewielka ilość cząsteczek eksponowanych w wyniku uszkodzenia tkanek uruchamia lawinową odpowiedź, która prowadzi do aktywacji fibrynogenu i tworzenie polimeru fibryny (włóknika). Niemalże równocześnie uruchamiany jest mechanizm przeciwny, obejmujący różnorakie inhibitory oraz czynniki fibryno-

lize, którego rolą jest zapewnienie kontroli krzepnięcia i ostatecznie rozkład fibryny, wtedy gdy czop włóknika jest już zbyt duży. W procesie hemostazy bardzo ważną rolę odgrywają płytki krwi, bezjądrzaste u ssaków, lub trombocyty, jądrzaste, u pozostałych kręgowców oraz śródbłonek naczyniowej (ŁOPACIUK i BIEDERMAN 2001).

Kaskadowy mechanizm zestania i kontroli płynności krwi jest niezwykle osiągnięciem ewolucyjnym kręgowców, którego wyłonienie się umożliwiło efektywną ochronę przed utratą płynów ciała oraz skuteczniejszą obronę przed wnikaniem patogenów. (AIRD 2003). Czy można jakoś poznać ewolucję tego układu? W jaki sposób doszło do powstania tak niezwykłego systemu kontroli płynności i zestania krwi u kręgowców? Na te pytania podjęta zostanie próba udzielenia odpowiedzi w tym artykule, w oparciu o najnowsze publikacje naukowe. Wcześniej jednakże zostanie omówiona budowa domenowa wybranych czynników hemostazy, gdyż znacznie ułatwi to zrozumienie problemów związanych z badaniem ewolucji tej grupy białek.

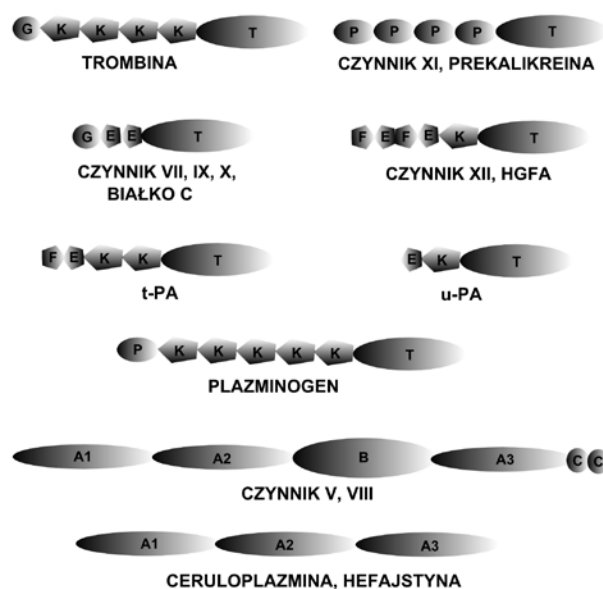
Wykaz skrótów i nazw angielskojęzycznych: BLAST – the Basic Local Alignment Search Tool (tłum. podstawowe narzędzie dopasowania sekwencji); EGF – Epidermal Growth Factor (tłum. czynnik wzrostu naskórka); FRED – Fibrinogen REleted Domain (tłum. domena „fibrynogenopodobna”); GLA – Gamma-carboxyglutamic Acid-rich domain (tłum. domeny bogate w kwas gamma-karboksylglutaminowy); HGF – Hepatocyte Growth Factor (tłum. czynnik wzrostu hepatocytów); HGFA – Hepatocyte Growth Factor Activator (tłum. aktywator czynnika wzrostu hepatocytów); NCBI – National Center for Biotechnology Information (tłum. narodowe centrum informacji biotechnologicznej); PAN – Protein Apple domain (tłum. białkowa domena jabłkowa); PFAM – Protein FAMILies Data Base (tłum. baza rodzin białkowych); PROSITE – PROtein SITE (tłum. miejsce / strona białek); SMART – Simple Modular Architecture Research Tool (tłum. proste narzędzie badań architektury modularnej); TSP1 – Thrombospondin type 1 repeats (tłum. powtórzenia trombospondynowe typu 1).

BUDOWA DOMENOWA BIAŁEK HEMOSTAZY

Bardzo liczną grupę czynników hemostazy stanowią enzymy o charakterze proteaz serynowych. Proteazy serynowe układu hemostazy charakteryzują się złożoną budową domenową, a każde z tych białek posiada kilka domen należących do różnych rodzin białkowych (Ryc. 1). Największą jest, zlokalizowana na C-końcu białka, domena odpowiadająca za aktywność proteolityczną. Nazywana jest zwykle domeną trypsynową, ze względu na podobieństwo do dobrze znanego enzymu trawiennego trypsyny.

Proteazy serynowe układu hemostazy posiadają dodatkowo różnorodne domeny, pochodząc od N-końca. Jedną z ważniejszych jest GLA, zawierająca reszty modyfikowanego aminokwasu – kwasu γ -glutaminowego. Do prawidłowego działania białka posiadającego taką domenę konieczna jest witamina K, gdyż związek ten jest kofaktorem enzymu γ -karboksylazy, odpowiadającego za modyfikację aminokwasu glutaminianu do γ -glutaminianu. Do białek krzepnięcia posiadających domenę GLA, należą: protrombina, czynnik VII, czynnik IX i czynnik X, białko C, białko S i białko Z. Domena trypsynowa białka Z jest nieaktywna, z powodu braku seryny i histydy w miejscach odpowiadających triadzie katalitycznej, a białko S takiej domeny w ogóle nie posiada, gdyż nie jest proteazą (JIANG i DOOLITTLE 2003).

Pozostałe N-końcowe domeny, występujące w proteazach układu hemostazy, to: domeny kringlowe, palce fibronektynowe (FN-1, FN-2 i FN-3), domeny czynnika wzrostu naskórka (EGF) i domeny jabłkowe (PAN). Domeny kringlowe są charakterystyczne dla protrombiny, czynnika XII, plazminogenu oraz tkankowego i urokinazowego aktywatora plazminogenu (t-PA i u-PA). Domeny EGF występują we wszystkich proteazach serynowych układu hemostazy za wyjątkiem protrombiny, plazminogenu, czynnika XI i prekalikreiny osoczowej. Domeny PAN występują w czterech kopiach w czynniku XI i prekalikreinie oraz w jednym powtórzeniu w plazminogenu (JIANG i DOOLITTLE 2003).



Ryc. 1. Budowa domenowa czynników układu hemostazy oraz ceruloplazminy i hefajstyny.

Domeny: T – domeny trypsynowe (proteazy serynowej); P – domeny jabłkowe (PAN); K – domeny kringlowe; F – domeny fibronektynowe; E – domeny czynnika wzrostu naskórka (EGF); A – domeny ferrodyazy zależnej od miedzi (domeny F5/8 typu A); B – domena F5/8 typu B; C – domeny dyskoidynowe (domeny F5/8 typu C).

Domeny charakterystyczne dla czynników hemostazy występują także w innych białkach, pełniących całkiem odmienne funkcje. Wymienić tutaj można dość powszechne domeny EGF i FN, ale także domenę ferrodyazy zależnej od miedzi (domena F5/8 typu A), która występuje w czynnikach krzepnięcia krwi V i VIII, w białku osocza krwi ceruloplazminie oraz w białku błonowym nabłonka jelit hefajstynie (Ryc. 1). Domena dyskoidynowa, nazywana także domeną F5/8 typu C, charakterystyczna dla czynników krzepnięcia krwi V i VIII (JIANG i DOOLITTLE 2003), występuje również w licznych białkach błonowych, między innymi w neuropilinach (KIEDZIERSKA i współaut. 2007).

BADANIE EWOLUCJI HEMOSTAZY

Początki poznawania podstaw biochemicznych układu hemostazy człowieka sięgają XIX w., lecz sam proces ewolucji krzepnięcia krwi kręgowców badany jest zaledwie

od ponad pół wieku. Wkrótce po ustaleniu sekwencji aminokwasowej niektórych czynników hemostazy zauważono, że pewne z nich wykazują podobieństwo do innych, nie

tylko w obrębie poszczególnych domen, ale także bardzo często w kolejności ich występowania. Jako przyczynę takich podobieństw uznano duplikację genów u dawnych przodków współczesnych organizmów (DOOLITTLE 1993).

Odkrywanie kolejnych tajników wyłaniania się układu hemostazy stało się możliwe dzięki zastosowaniu czterech strategii badawczych. W dwóch pierwszych poznawane były mechanizmy krzepnięcia krwi „prostszych” zwierząt, z zastosowaniem metod biochemicznych, a wyniki porównywano z wcześniej zgromadzoną wiedzą o krzepnięciu krwi człowieka. Kolejne podejście opierało się na oczyszczeniu każdego z czynników układu hemostazy, określeniu jego właściwości chemicznych, a następnie znalezie-

niu odpowiadającego składnika u człowieka (DOOLITTLE 1993). Trzecia strategia możliwa stała się dzięki rozwojowi metod genetyki molekularnej i obejmuje klonowanie molekularne oraz sekwencjonowanie DNA. Czwarte podejście to metody bioinformatyczne, które możliwe stały się dzięki rozwojowi informatyki oraz przyrostowi mocy obliczeniowej i pamięci komputerów. Bez trzeciej strategii nie stałoby się to możliwe, w tym bez programów badawczych obejmujących sekwencjonowanie całych genomów różnych organizmów. Metody komputerowej analizy sekwencji DNA i kodowanych przez nie białek umożliwiają rekonstruowanie ewolucji układu hemostazy *in silico*, ograniczając kosztowne badania *in vitro* czy *ex vivo*.

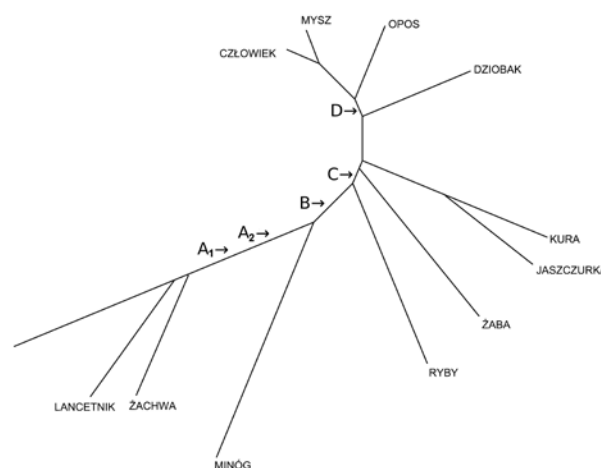
PRZESZUKOWANIE SEKWENCJI GENOMOWYCH

W pełni zsekwencjonowane genomy strunowców: zachwy, lancetnika, minoga, ryb – rozdymki tygryskiej (*Takifugu rubripes*) i danio pręgowanego (*Danio rerio*), żab (*Xenopus tropicalis*, *Xenopus laevis*), zielonej jaszczurki amerykańskiej (*Anolis carolinensis*), kury, dziobaka (*Ornithorhynchus anatinus*), i oposa (*Monodelphis domestica*) (Ryc. 2) zostały użyte jako baza danych w poszukiwaniu odpowiedników około 20 różnych genów związanych z układem hemostazy człowieka i myszy (JIANG i DOOLITTLE 2003, DOOLITTLE i współaut. 2008, PONCZEK i współaut. 2008, DOOLITTLE 2009).

Procedura znajdowania homologów białek hemostazy rozpoczyna się od zlokalizowania potencjalnych genów w bazach genomowych za pomocą algorytmu BLAST, przy użyciu znanych sekwencji człowieka lub innych ssaków jako wzorców. Sekwencje najlepszych „trafień” zostają zweryfikowane poprzez zastosowanie ich jako matryc w przeszukiwaniach programem BLAST względem bazy białek NCBI. Jeśli taka dodatkowa procedura zwróci wyjściowe białko wzięte jako wzorzec, można przyjąć, że wynik jest prawidłowy. Dodatkowym potwierdzeniem będzie identyczność budowy domenowej szukanego białka, co można szybko sprawdzić, na podstawie sekwencji, za pomocą takich narzędzi jak PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite/>), PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), czy SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Jeśli jednakże inne białka dają lepsze wyniki, mamy do czynienia raczej z paralogiem – spokrewnionym białkiem, ale najprawdopo-

dobniej o innej pełnionej funkcji (DOOLITTLE 2009).

Niestety strategia taka nie jest pozbawiona błędów. Nie wszystkie bazy genomowe są kompletne i nie zawsze wszystkie fragmenty sekwencji są prawidłowo zestawione (asem-



Ryc. 2. Związki filogenetyczne pomiędzy strunowcami – dywergencja poszczególnych grup organizmów i wyłanianie się kolejnych elementów hemostazy.

A – 1 pojawienie się czynnika tkankowego, trombiny i prostej odpowiedzi komórkowej; – 2 wyłonienie się fibrynogenu oraz czynników X i VIII; B – duplikacje prowadzące do powstania czynnika IX z X i VIII z V; C – pojawienie się czynnika XII i prekalikreiny; D – wykształcenie aktywacji krzepnięcia krwi poprzez czynniki kontaktu – duplikacja prowadzi do oddzielenia czynnika XI od prekalikreiny.

blowane). Łatwiej stwierdzić występowanie jakiegoś genu niż udowodnić jego brak. Szybkość utrwalania mutacji, i co za tym idzie ewolucji po duplikacji genu, nie zawsze jest taka sama względem genów potomnych. Trudno jest więc czasami ustalić relacje pokrewieństwa między białkami. Dlatego nieła-

two jest często odróżnienie, badając bazy genomów, ortologów, faktycznych odpowiedników szukanych białek, od paralogów, białek homologicznych, ale wyspecjalizowanych do pełnienia odmiennych funkcji w organizmie (DOOLITTLE 2009).

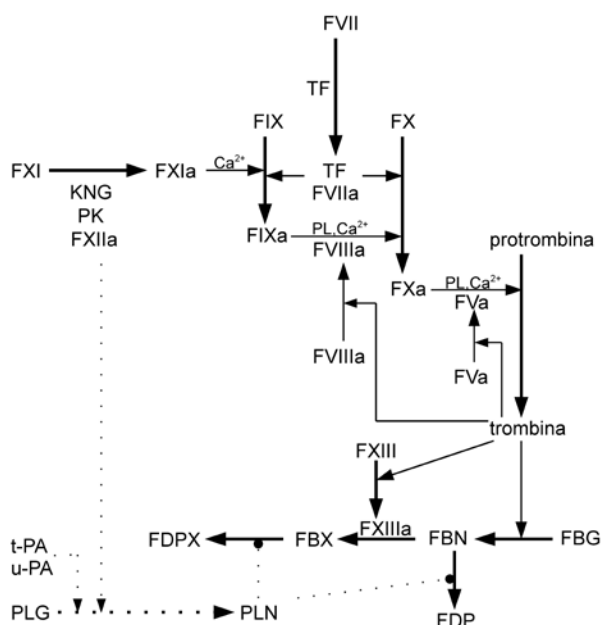
OBCENY OBRAZ EWOLUCJI UKŁADU HEMOSTAZY

Poczynając od gromady kręgowców, a kończąc na ssakach, krzepnięcie krwi zachodzi, gdy proteaza serynowa trombina przekształca rozpuszczalny fibrynogen w nierozpuszczalną fibrynę (Ryc. 3). Sama trombina jest produktem proteolitycznego przekształcenia protrombiny, co możliwe jest po aktywacji kaskady czynników krzepnięcia (BLOM-BACK 1996).

Obecność trombiny i jej aktywację przez proteazy serynowe zależne od witaminy K, stabilizację fibrynogenu przez czynnik XIII

oraz fibrylizację stwierdzono nawet u bezżuchwoców (minóg morski *Petromyzon marinus*) – najbardziej prymitywnych przedstawicieli kręgowców (DOOLITTLE 1965). Opisywanych mechanizmów brak jest u prostych strunowców, takich jak lancetnik (na przykładzie gatunku *Branchiostoma floridae*) czy żachwa (na przykładzie gatunku *Ciona intestinalis*) oraz u bezkręgowców (DOOLITTLE 1993).

Badania genomów prostych strunowców na przykładzie lancetnika i żachwy wykazały, mimo występowania genów zawierających domeny analogiczne do fibrynogenu (FRED) oraz kilku proteaz bardzo podobnych do protrombiny, że żadne z nich nie są prawdziwym fibrynogenem i prawdziwą, funkcjonalną protrombiną (DOOLITTLE 2009). Białka „trombinopodobne” cechuje dość duże, około 40% podobieństwo sekwencyjne w obrębie domeny trypsynowej, ale brak jest typowych domen N-końcowych, w szczególności domeny GLA. Obecna jest także u lancetnika proteaza serynowa z dwukrotnie powtarzającymi się N-końcowymi domenami kringłowymi, z domeną trypsynową w około 43% podobną do domeny proteazowej plazminogenu (5 domen kringlowych) i do niefunkcjonalnej domeny trypsynowej apolipoproteiny A (50 domen kringlowych) u człowieka (DOOLITTLE 2009). Podobieństwo do czynnika IX, protrombiny i czynnika wzrostu hepatocytów (HGF) wynosi odpowiednio 39%, 34% i 33%. Na uwagę zwracają pewne podobieństwa do plazminogenu ssaków, takie jak: miejsce aktywacji przez tkankowy aktywator plazminogenu *in silico* i aktywacja rekombinowanego białka przez urokinazowy aktywator plazminogenu człowieka *in vitro*. Opisane białko lancetnika posiada dwie domeny kringłowe zawierające miejsca wiążące lizynę (cecha typowa dla plazminogenu, choć białko kręgowców posiada o trzy domeny kringłowe więcej), nie ma domeny PAN i prawdopodobnie pełni nieco odmienną funkcję niż plazminogen kręgowców (brak fibryno-

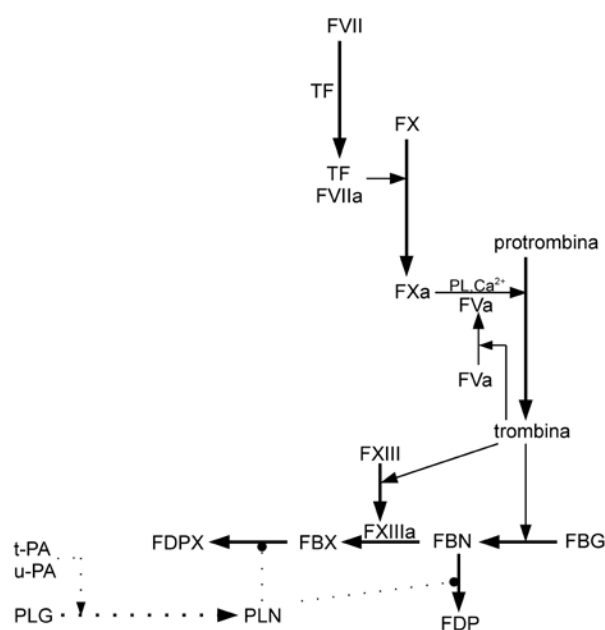


Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie układu hemostazy człowieka.

F – czynniki krzepnięcia krwi, FBG – fibrynogen, FBN – fibryna, FBX – fibryna stabilizowana przez czynnik XIII, FDP – produkty degradacji fibryny, FDPX – produkty degradacji fibryny stabilizowanej, KNG – wielkocząsteczkowy kininogen, PK – prekalikreina osoczowa, PL – fosfolipidy, PLG – plazminogen, PLN – plazmina, t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu, u-PA – urokinazowy aktywator plazminogenu. Procesy związane z krzepnięciem linie ciągłe, procesy związane z fibrylizacją linie przerywane.

geny u prymitywnych strunowców), mimo że dla gatunku lancetnika *Branchiostoma belcheri tsingtauense* zostało sklonowane i zapisane w bazach danych pod nazwą „plazminogen” (LIU i ZHANG 2009). Osłonice, do których należą żachwy, zostały ostatnio uznane, na podstawie badań genetycznych, za bliżej spokrewnione z kręgowcami, niż strunogłowe (bezczaszkowce), do których zalicza się lancetnik (PUTNAM i współaut. 2008). Także w tej grupie zwierząt nie udało się wykryć fibrynogenu i trombiny, chociaż wiadomo, że organizmy te utraciły wiele genów przechodząc do osiadłego trybu życia (genom lancetnika 540 MB – genom żachwy 330 MB). U żachwy *Ciona intestinalis* występuje jednakże, jak u lancetnika, dwukręglowe białko „plazminogenopodobne” (JIANG i DOOLITTLE 2003). Białko to w odróżnieniu od plazminogenu kręgowców, zamiast domeny PAN na N-końcu, posiada powtórzenia trombospondynowe typu 1 (TSP1), a domena trypsynowa podobna jest w 39% do analogicznej domeny plazminogenu. Niestety brak jest obecnie danych na temat funkcji biologicznej białek podobnych do plazminogenu u prymitywnych strunowców.

Od dawna wiadomo, że minóg, którego dywergencja nastąpiła przed pojawieniem się kręgowców żuchwowych, posiada fibrynogen i trombinę (COTTRELL i DOOLITTLE 1976). Badania bioinformatyczne zsekwenconowanego genomu minoga umożliwiły ustalenie, że u tego bezzuchwowca kaskada krzepnięcia wydaje się być nieco prostsza (DOOLITTLE i współaut. 2008). Minóg posiada czynnik tkankowy oraz czynnik VII, ale czynniki V i VIII mają u tego organizmu tylko jeden odpowiednik funkcjonalnie odpowiadający czynnikowi V, choć aż w trzech homologicznych kopiach. Odpowiednio dla czynnika IX i X występuje jeden prekursor, czynnościowo odpowiadający czynnikowi X, choć w dwóch wariantach (DOOLITTLE 2009). U ssaków czynniki IX i VIII oraz X i V tworzą kompleksy, zatem u bezzuchwówców jest tylko jedna taka para. U bezzuchwówców istnieje prawdopodobnie uproszczony system aktywacji krzepnięcia krwi (Ryc. 4), odpowiadający mechanizmom występującym u wyższych kręgowców, dawniej zwanym zewnątrzpocho-dnym szlakiem aktywacji krzepnięcia krwi. Począwszy od minoga, pojawiają się elementy układu fibrynolizy – „pełnodomenowy” plazminogen, oraz prawidłowe aktywatory tego białka – tkankowy i urokinazowy (DOOLITTLE i współaut. 2008).



Ryc. 4. Hipotetyczny prostszy układ hemostazy minoga.

F – czynniki, FBG – fibrynogen, FBN – fibryna, FBX – fibryna stabilizowana, FDP – FDPX – produkty degradacji fibryny, FDPX – produkty degradacji fibryny stabilizowanej, PL – fosfolipidy, PLG – plazminogen, PLN – plazmina, t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu, u-PA – urokinazowy aktywator plazminogenu. Procesy związane z krzepnięciem linie ciągłe, procesy związane z fibrynolizą linie przerywane.

Ryby kostnoszkieletowe mają już wyodrębnione dwie pary czynników, odpowiednio IX i VIII oraz X i V (JIANG i DOOLITTLE 2003).

Omówione wcześniej grupy kręgowców nie posiadają w ogóle tzw. układu kontaktu, czyli czynnika XII, XI i prekalikreiny osoczowej oraz wielkocząsteczkowego kininogenu. U ryb występuje jednakże gen białka homologicznego do aktywatora czynnika wzrostu hepatocytów (HGFA), który jest paralogiem czynnika XII u człowieka (PONCZEK i współaut. 2008). Znalaziono także u ryb kininogen podobny do białka ssaków, jednakże bez segmentu bogatego w histydyne, który jest niezbędny do aktywności w układzie kontaktu. Sekwencja taka pojawia się po raz pierwszy dopiero u płazów (ZHOU i współaut. 2008). Gen czynnika XII jest obecny u płazów, gadów, ssaków łożyskowych i oposa (przedstawiciela torbaczy), natomiast brak go u kury. Paralogi – czynnik XII i HGFA – położone są u ssaków na odrębnych chromo-

Tabela 1. Występowanie genów wybranych proteaz hemostazy i ich paralogów wśród kręgowców.

Organizm	Czynnik IX	Czynnik X	Czynnik XI	Prekalikreina	Czynnik XII	HGFA
Człowiek	+	+	+	+	+	+
Opos	+	+	+	+	+	+
Dziobak	+	+	-	+	+	+
Kura	+	+	-	+	-	+
Jaszczurka	+	+	-	+	+	+
Żaba	+	+	-	+	+	+
Danio	+	+	-	-	-	?
Fugu	+	+	-	-	-	+
Minóg	-	+	-	-	-	+

somach, a u żaby *Xenopus* znaleziono je na odrębnych fragmentach sekwencjonowanego DNA. W przypadku ptaków doszło do utraty genu dla czynnika XII (PONCZEK i współaut. 2008). Jest to w zgodzie z ponad stuletnimi obserwacjami wydłużonego czasu krzepnięcia krwi na drodze kontaktu u kury oraz z niedawnymi badaniami biochemicznymi u sępa i strusia (FROST i współaut. 1999, WEIR i współaut. 2004).

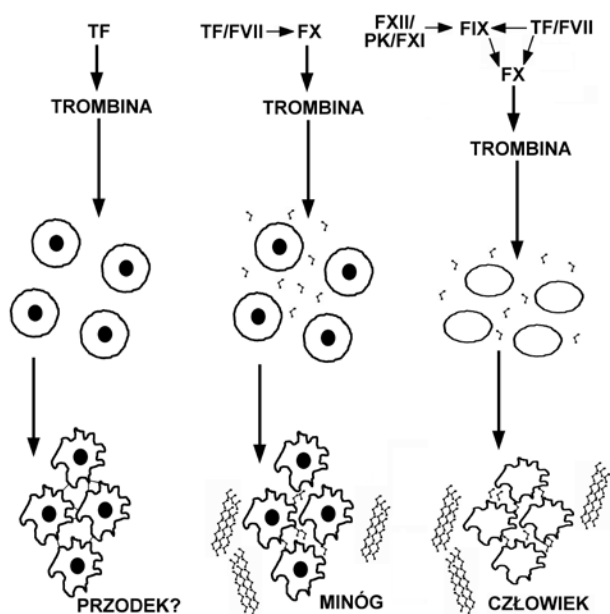
Jeśli chodzi o pozostałe proteazy kontaktu, pojedynczy gen, odpowiadający przodkowi czynnika XI i prekalikreiny, znaleziono u żaby, kury i dziobaka. Białko to przypomina prekalikreinę ssaków łóżyskowych, ponieważ w czwartej domenie PAN posiada dwie zachowane reszty cysteinowe (321 i 326

wg. numeracji człowieka), które tworzą wewnątrzłańcuchowe wiązanie disulfidowe. Czynnik XI w pozycji odpowiadającej Cys 326 prekalikreiny posiada glicynę, a obecność niesparowanej Cys 321 daje nową ewolucyjnie własność formowania przez to białko homodimerów. Co więcej, podobnie jak w prekalikreinie, w trzeciej domenie PAN brakuje sekwencji koniecznych do wiązania z płytkami krwi, kolejnej cechy charakterystycznej dla czynnika XI. Opos posiada podobnie do ssaków łóżyskowych zarówno prekalikreinę jak i czynnik XI. Identycznie jak u człowieka, geny paralogów PK i FXI położone są jeden za drugim na tym samym chromosomie, wskazując na duplikację lokalną (PONCZEK i współaut. 2008).

PODSUMOWANIE

Niezwykle skomplikowane układy białek są efektem wielu serii duplikacji, mutacji i tasowania domen w obrębie genomów przodków współcześnie istniejących organizmów. Fibrynogen, kluczowe białko krzepnięcia występuje tylko u kręgowców. Nie udało się go wykryć u pierwotnych strunowców takich jak lancetnik, czy żachwa zarówno w badaniach biochemicznych jak i bioinformatycznych. Można zatem przyjąć, że polimeryzacja fibrynogenu, zapoczątkowana trombiną pojawiła się w okresie około 50-100 milionów lat pomiędzy pojawieniem się prymitywnych strunowców a wyodrębnieniem się bezżuchwoców (DOOLITTLE 2009). Cały skomplikowany system regulacji układu hemostazy człowieka i innych ssaków zaczął się kształto-

wać około 450 milionów lat temu (DAVIDSON i współaut. 2003). W pełni ukształtowana aktywacja przez kontakt (dawniej wewnątrzpochodny szlak aktywacji krzepnięcia krwi) jawi się jako najmłodsze ewolucyjnie osiągnięcie ssaków (Ryc. 1). W prostszym systemie minoga jest mniej potencjalnych miejsc regulacji hemostazy. W złożonym układzie ssaków, występują nowe szlaki aktywacji i hamowania krzepnięcia oraz fibrynolizy. Być może u wspólnego przodka bezzuchwoców i żuchwoców istniał jeszcze prostszy system w którym ortolog trombiny bezpośrednio aktywował trombocyty, a te zlepiając się hamowały krwawienie (DOOLITTLE 2009). Pojawienie się fibrynogenu umożliwiło, poza interakcjami międzykomórkowymi, tworze-



nie dodatkowej „stałej masy” czopującej ranę. Dalsza komplikacja systemu doprowadziła do wykształcenia obecnego systemu hemostazy ssaków (Ryc. 5). Badania *in silico* genomów strunowców dostarczyły interesujących informacji na temat pojawiania się kolejnych elementów układu hemostazy, lecz nie są w stanie całkowicie zastąpić badań *in vitro* i *in vivo*. Brak jest nadal dokładnej wiedzy na temat różnic w funkcjonowaniu tego układu u niższych i wyższych kręgowców. Nieliczne badania biochemiczne dostarczają jedynie ogólnych danych na ten temat. Nowe informacje, uzyskane metodami bioinformatycznymi, pozwalają zaplanować kolejne doświadczenia laboratoryjne. Powstanie układu

Ryc. 5. Ewolucja układu hemostazy z uwzględnieniem udziału wyspecjalizowanych komórek.

U hipotetycznego przodka ortolog trombiny w obecności czynnika tkankowego, uwalnianego z uszkodzonych tkanek, działa na jądrzaste komórki podobne do trombocytów. Aktywacja i agregacja komórek prowadzi do utworzenia czopu hemostaticznego bez udziału fibrynogenu. U minoga występuje prosta kaskada krzepnięcia, prowadząca od czynnika tkankowego do aktywacji protrombiny. Trombina, pobudza trombocyty i dodatkowo uruchamia przekształcanie fibrynogenu w fibrynę. Monomery fibryny stanowią dodatkowo spajające agregujące trombocyty, a fibryna wzmacnia skrzep. U ssaków, na przykładzie człowieka, występują silnie wyspecjalizowane, bejądrzaste płytki krwi, bardziej złożona kaskada krzepnięcia, prowadząca od czynnika tkankowego do aktywacji protrombiny, oraz dodatkowo pojawia się jeszcze szlak aktywacji krzepnięcia krwi poprzez czynniki kontaktu.

hemostazy jest doskonałym przykładem wyłaniania się coraz większej złożoności w wyniku ewolucji, a jego pełniejsze poznanie przyczyni się do lepszego zrozumienia formowania się coraz bardziej skomplikowanych mechanizmów zachodzących w żywych istotach.

Praca ta nie powstałaby bez krótkoterminowego programu stypendialnego Europejskiej Organizacji Biologii Molekularnej (ang. EMBO Short-Term Fellowship) oraz opieki Russela Doolittle'a, w trakcie odbywania trzymiesięcznego stażu po-doktorskiego ASTF 83.00-2008 na UCSD (ang. University of California, San Diego).

EVOLUTION OF VERTEBRATE HEMOSTATIC SYSTEM

Summary

The extremely complicated systems of proteins are a result of many series of duplications and shuffling of domains in genomes of predecessors of nowadays living creatures. Fibrinogen, a key blood clotting protein, is characteristic only for vertebrates. The protein could not be found in chordates like lancelet or sea squirt by biochemical nor bioinformatic methods. It can be supposed that fibrin po-

lymerization triggered by thrombin occurred within the 50-100-million-year time between the appearance of protochordates and vertebrates. The whole complicate system of haemostasis and its regulation started to form about 450 million years ago. The fully developed contact phase of blood coagulation seems to be the latest evolutionary achievement of mammals.

LITERATURA

AIRD W. C., 2003. *Hemostasis and irreducible complexity*. J. Thromb. Haemost. 1, 227-230.
BLOMBACK B., 1996. *Fibrinogen and fibrin – proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis*. Thromb. Res. 83, 1-75.

COTTRELL B. A., DOOLITTLE R. F., 1976. *Amino acid sequences of lamprey fibrinopeptides A and B and characterizations of the junctions split by lamprey and mammalian thrombins*. Biochim. Biophys. Acta 453, 426-438.

- DAVIDSON C. J., TUDDENHAM E. G., MCVEY J. H. 2003. *450 million years of hemostasis*. J. Thromb. Haemost. 1, 1487-1494.
- DOOLITTLE R. F., 1965. *Differences in the clotting of lamprey fibrinogen by lamprey and bovine thrombins*. Biochem. J. 94, 735-741.
- DOOLITTLE R. F., 1993. *The evolution of vertebrate blood coagulation: a case of Yin and Yang*. Thromb. Haemost. 70, 24-28.
- DOOLITTLE R. F., JIANG Y., NAND J., 2008. *Genomic evidence for a simpler clotting scheme in jawless vertebrates*. J. Mol. Evol. 66, 185-196.
- DOOLITTLE R. F., 2009. *Step-by-Step Evolution of Vertebrate Blood Coagulation*. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. (w druku).
- FROST C. L., NAUDE R. J., OELOFSEN W., JACOBSON B., 1999. *Comparative blood coagulation studies in the ostrich*. Immunopharmacology 45, 75-81.
- JIANG Y., DOOLITTLE R. F., 2003. *The evolution of vertebrate blood coagulation as viewed from a comparison of puffer fish and sea squirt genomes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 7527-7532.
- KIEDZIERSKA A., SMIETANA K., CZEPCZYNSKA H., OTLEWSKI J., 2007. *Structural similarities and functional diversity of eukaryotic discoidin-like domains*. Biochim. Biophys. Acta 1774, 1069-1078.
- LIU M., ZHANG S., 2009. *A kringle-containing protease with plasminogen-like activity in the basal chordate Branchiostoma belcheri*. Biosci. Rep. 29, 385-95.
- ŁOPACIUK S., BIEDERMAN A., 2001. *Zakrzepy i zatory*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
- PONCZEK M. B., GAILANI D., DOOLITTLE R. F., 2008. *Evolution of the contact phase of vertebrate blood coagulation*. J. Thromb. Haemost. 6, 1876-1883.
- PUTNAM N. H., BUTTS T., FERRIER D. E., FURLONG R. F., HELLSTEN U., KAWASHIMA T., ROBINSON-RECHAVI M., SHOGUCHI E., TERRY A., YU J. K. i współaut., 2008. *The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype*. Nature 453, 1064-1071.
- WEIR M. J., ACURERO Z., SALAS A. R., ARTEAGA-VIZCAINO M., 2004. *Blood coagulation factors in the black headed vulture (Coragyps atratus), a potential animal model for the study of haemostasis*. Thromb. Res. 113, 269-73.
- ZHOU L., LI-LING J., HUANG H., MA F., LI Q., 2008. *Phylogenetic analysis of vertebrate kininogen genes*. Genomics 91, 129-141.