

AGNIESZKA GAJAK, MICHAŁ BIJAK, PAWEŁ NOWAK

*Katedra Biochemii Ogólnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
E-mail: mbijak@biol.uni.lodz.pl*

CZYNNIK XIII KRZEPNIĘCIA KRWI JAKO SPECYFICZNA TRANSGLUTAMINAZA*

WPROWADZENIE

Historia odkrycia czynnika XIII krzepnięcia krwi sięga lat 20. XX w. W tym okresie Barkan i Gaspar po raz pierwszy zaobserwowali powstawanie nierozpuszczalnego skrzepu fibrynowego w obecności jonów Ca^{2+} . Dwadzieścia lat później ROBBINS (1944) przeprowadził eksperyment na wyizolowanym fibrynogenie i odkrył, że generowanie nierozpuszczalnej sieci fibrynowej związane jest nie tylko z występowaniem jonów Ca^{2+} w środowisku reakcyjnym, lecz proces ten wymaga również obecności nieznanego, osoczowego czynnika. Następnie, dwaj węgierscy biochemicy, Koloman Laki i Laszlo Lorand (LAKI i LORAND 1948), potwierdzili wcześniejsze odkrycie Robbinsa i uznali, że nieznaną osoczową czynnik powoduje powstawanie skrzepu fibrynowego nierozpuszczalnego nawet w stężonym roztworze mocznika. Nieznane białko zostało przez nich nazwane czynnikiem stabilizującym fibrynę (ang. fibrin stabilizing factor, FSF). Znaczenie tego odkrycia zostało docenione dopiero kilkanaście lat później przez DUCKERTA i współaut. (1960), którzy po raz pierwszy opisali objawy kliniczne niedoboru czynnika stabilizującego fibry-

nę. Międzynarodowy Komitet Mianownictwa Czynników Krzepnięcia Krwi w 1963 r. nazwał FSF czynnikiem XIII krzepnięcia krwi (ang. factor XIII, FXIII). W celu upamiętnienia nazwisk jego odkrywców określa się go również jako czynnik Laki-Loranda. Początkowo, czynnik XIII nie wzbudził wielkiego zainteresowania wśród naukowców. Stopniowo odkrywano jego znaczenie w różnych procesach fizjologicznych, gdy jednak dostrzeżono jego zaangażowanie w procesy patologiczne i związane z nimi choroby, badania nad mechanizmami biochemicznymi tego białka zostały wzmożone. Czynnik XIII jest jednocześnie ważnym elementem kaskady krzepnięcia krwi i enzymem należącym do rodziny transglutaminaz. Mechanizm działania transglutaminaz opiera się na wstawianiu wiązań izopeptydowych pomiędzy substratami białkowymi, co zapewnia czynnikowi XIII udział w licznych procesach fizjologicznych. FXIII jest jedną z dziewięciu transglutaminaz występujących w organizmie człowieka, które wykazują między sobą wysoki stopień homologii strukturalnej i funkcjonalnej (HSIEH i NUGENT 2008, MUSZBEK i współaut. 2011).

*Praca powstała w ramach grantu Uniwersytetu Łódzkiego nr 506/810 i 545/485

CHARAKTERYSTYKA ENZYMÓW NALEŻĄCYCH DO RODZINY TRANSGLUTAMINAZ

AP	β -kanapka	Domena rdzeniowa	β -beczułka 1	β -beczułka 2
----	------------------	------------------	---------------------	---------------------

Ryc. 1. Schemat domenowej budowy transglutaminaz AP – peptyd aktywacyjny ulegający proteolitycznemu rozszczepieniu podczas aktywacji enzymu.

Termin transglutaminaza (ang. transglutaminase, TG) został po raz pierwszy wprowadzony przez CLARKE i współaut. (1959) do opisu transamidacyjnej aktywności obserwowanej w wątrobie świnki morskiej. Późniejsze badania wykazały, że transglutaminazy są szeroko rozpowszechnionymi białkami niezbędnymi do prawidłowego funkcjonowania wielu organizmów. Ich obecność stwierdzono w licznych tkankach kręgowców, bezkręgowców, roślin jak również w komórkach mikroorganizmów (GRIFFIN i współaut. 2002, WOLNIK-TRZECIAK i współaut. 2005).

Transglutaminazy (E.C. 2.3.2.13) stanowią grupę blisko spokrewnionych ze sobą enzymów, wykazujących strukturalne i funkcjonalne podobieństwo. Genom człowieka zawiera dziewięć genów kodujących transglutaminazy, które cechuje wysoka konserwatywność (WOLNIK-TRZECIAK i współaut. 2005, SAMELAK i współaut. 2010). Wśród ludzkich transglutaminaz wyróżnia się osiem białek o charakterze zymogenów/enzymów, takich jak: FXIII, TG1, TG2, TG3, TG4, TG5, TG6, TG7 oraz jedno białko pozbawione aktywności katalitycznej, tzw. białko pasma 4.2 erytrocytów (Tabela 1). Jednostka strukturalna (monomeryczna) każdej transglutaminazy zbudowana jest z czterech domen: N-terminalnej β -kanapki, domeny rdzeniowej (katalitycznej) oraz dwóch C-terminalnych domen: β -beczułki 1 oraz β -beczułki 2 (Ryc. 1). FXIII i TG1 posiadają dodatkowo N-terminalny peptyd aktywacyjny (AP), który w czasie aktywacji ulega odszczepieniu od pozostałej części białka. Najważniejszą rolę w aktywności enzymatycznej transglutaminaz odgrywa domena rdzeniowa, ponieważ zawiera centrum aktywne z triadą katalityczną zbudowaną z trzech reszt aminokwasowych: cysteiny, histydyny i asparagianinu. Domena rdzeniowa zawiera także miejsce wiązania jonów Ca^{2+} , które są konieczne do aktywacji transglutaminaz. Domena rdzeniowa obejmuje także niezbędną do stabilizacji stanu przejściowego resztę tryptofanu, a w przypadku

niektórych transglutaminaz również region odpowiedzialny za wiązanie i hydrolizę ATP oraz GTP. Brak aktywności enzymatycznej białka pasma 4.2 jest spowodowany podstawieniem alaniny w miejsce cysteiny centrum aktywnego. Białko to zaliczane jest jednak do rodziny transglutaminaz ze względu na wysoki stopień homologii strukturalnej (IISMAA i współaut. 2009, KOMAROMI i współaut. 2011).

Najważniejszą biologiczną funkcją transglutaminaz jest katalizowanie nieodwracalnych, potranslacyjnych modyfikacji białek, które polegają na utworzeniu wiązania izopeptydowego między pierwszorzędową grupą aminową substratu a resztą glutaminy łańcucha polipeptydowego. Reakcje katalizowane przez transglutaminazy wykazują dwustopniowy mechanizm (Ryc. 2). Początkowo transglutaminazy wymagają do swej aktywacji jonów Ca^{2+} . W postaci nieaktywnej bowiem, centrum aktywne enzymu znajduje się w zagłębieniu domeny rdzeniowej i jest chronione przed kontaktem z substratami przez dwie C-końcowe domeny. W obecności jonów Ca^{2+} dochodzi do zmiany konformacji, a tym samym do pełnej ekspozycji centrum aktywnego, w którym obecna jest reszta cysteiny. Grupa tiolowa reszty cysteiny reaguje wówczas z grupą γ -karboksamidową reszty glutaminy prowadząc do utworzenia produktu pośredniego, tzw. acyloenzymu, i jednoczesnego uwolnienia amoniaku. W drugim etapie reakcji dochodzi do przeniesienia grupy acylowej z produktu pośredniego na grupę ϵ -aminową reszty lizyny w białku w wyniku czego powstaje wiązanie izopeptydowe typu γ -glutamyl- ϵ -lizynowego. Towarzyszy temu regeneracja reszty cysteiny w centrum aktywnym, dlatego transglutaminaza jest w stanie przeprowadzać kolejne reakcje (RICOTTA i współaut. 2010). Innymi akceptorami grupy acylowej mogą być również aminy, np. histamina, lub poliaminy takie jak: putrescyna, spermidyna czy spermina, przez co utworzone zostają wiązania γ -glutamyl-aminowe lub γ -glutamyl-poliaminowe

(MARTIN i współaut. 2011). Poza reakcjami transacylacji transglutaminazy pośredniczą także w innych potranslacyjnych modyfikacjach białek, np. w reakcjach hydrolizy czy estryfikacji. W niekorzystnych warunkach, np. niskie pH lub brak donoru grupy aminowej, enzymy te mogą przenosić grupę γ -karboksamidową reszty glutaminy na cząsteczkę wody. Dochodzi wówczas do hydrolizy wiązania amidowego, a w efekcie do powstania produktów: amoniaku i reszty kwasu glutaminowego (RICOTTA i współaut. 2010).

Estryfikowane produkty powstają natomiast wtedy, gdy substratem dla grupy γ -karboksamidowej jest alkohol. Wszystkie transglutaminazy wykazują podobny mechanizm działania, ale różnią się swoistością substratową (IISMAA i współaut. 2009). Konsekwencją katalizowanych przez nie reakcji jest powstanie stabilnych i odpornych na proteolizę wiązań krzyżowych między różnymi

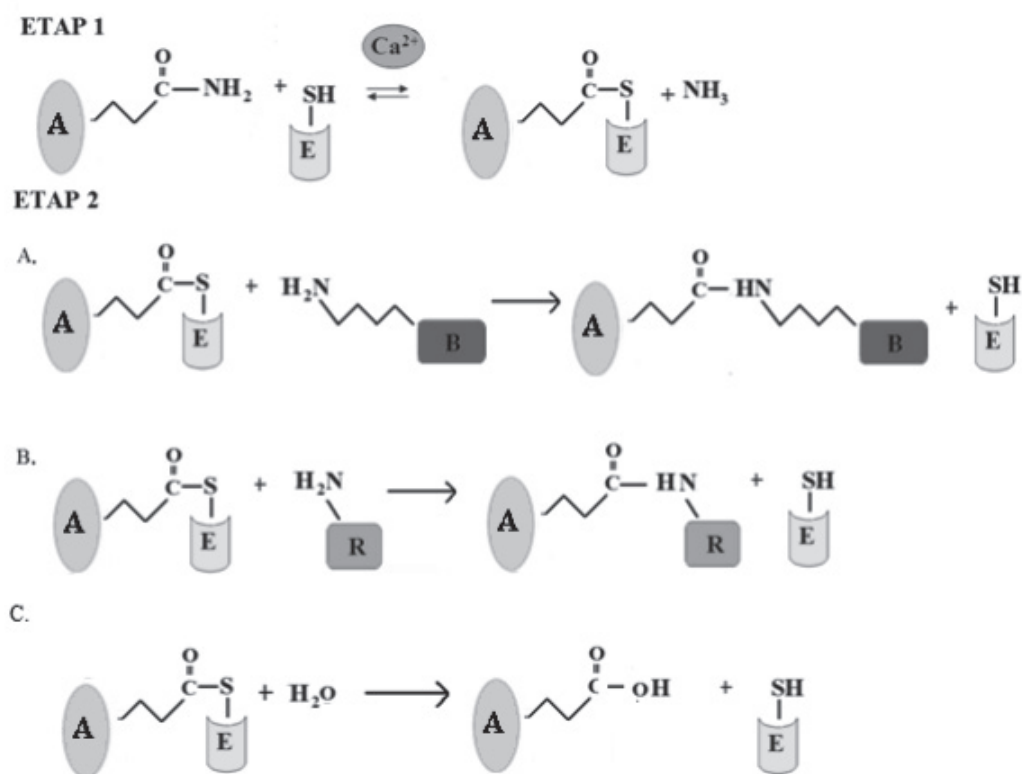
białkami lub w obrębie tego samego białka, co w następstwie przyczynia się do polimeryzacji białek, tworzenia różnych struktur oraz zachowania integralności tkanek. Ze względu na zaangażowanie transglutaminaz w proces sieciowania białek często określa się je mianem „kleju biologicznego” (WOLNIK-TRZECIAK i współaut. 2005, SAMELAK i współaut. 2010).

Transglutaminazy biorą udział w licznych procesach fizjologicznych, np. krzepnięciu krwi, gojeniu się ran, różnicowaniu komórek czy też apoptozie komórek (Tabela 1). Odgrywają więc istotną rolę w funkcjonowaniu organizmów żywych. Poniżej przedstawiono charakterystykę ludzkich transglutaminaz oraz pełnione przez nie funkcje.

Transglutaminaza keratynocytowa (ang. keratinocyte transglutaminase, TGk lub type 1 transglutaminase, TG1) jest enzymem, który bierze udział w terminalnym różnicowaniu keratynocytów. TG1 występuje w górnych

Table 1. Zestawienie białek należących do transglutaminaz wraz z ich najbardziej charakterystycznymi cechami

Nazwa oficjalna	Nazwa zwyczajowa	Cechy charakterystyczne
TG1	Transglutaminaza keratynocytowa	– Występuje w górnych warstwach naskórka – Bierze udział w różnicowaniu keratynocytów – Występuje w różnorodnych tkankach i narządach („wszechobecna”)
TG2	Tkankowa transglutaminaza	– Sieciuje zarówno białka wewnątrzkomórkowe jak i zewnątrzkomórkowe – Występuje w cytoplazmie keratynocytów
TG3	Naskórkowa transglutaminaza	– Sieciuje białka takie jak: jak: lorikryna, inwolukryna, cystatyna α – Wstawia wiązania krzyżowe między białkami znajdującymi się w mieszczkach włosowych – Występuje w gruczole krokowym
TG4	Transglutaminaza gruczołu krokowego	– Brak stwierdzonej funkcji pełnionej w organizmie ludzkim – U gryzoni pełni funkcję w procesie rozrodczym – Występuje w ziarnistej i kolczystej warstwie naskórka
TG5	Transglutaminaza X	– Sieciuje białka epidermalne, takie jak: keratyna, wimentyna, tubulina, dzięki czemu bierze udział w różnicowaniu komórek naskórka
TG6	Transglutaminaza Y	– Brak informacji na temat występowania i spełnianych funkcji
TG7	Transglutaminaza Z	– Brak informacji na temat występowania i spełnianych funkcji – Brak aktywności katalitycznej
Białko pasma 4.2 erytrocytów	Brak nazwy zwyczajowej	– Odgrywa rolę w regulacji kształtu i własności mechanicznych erytrocytów.
Czynnik XIII krzepnięcia krwi	Czynnik stabilizujący fibrynę, Czynnik Łaki-Loranda	– Stabilizuje polimery utworzonej z fibrynogenu fibryny poprzez wstawianie wiązań kowalencyjnych



Ryc. 2. Przykładowe reakcje katalizowane przez transglutaminazy z uwzględnieniem ich dwuetapowego mechanizmu.

W pierwszym etapie grupa tiolowa aktywnego enzymu reaguje z grupą γ -karboksamidową reszty glutaminy, w wyniku czego dochodzi do utworzenia produktu pośredniego tzw. acyloenzymu oraz uwolnienia amoniaku. W drugim etapie następuje przeniesienie grupy acylowej z produktu pośredniego na grupę ϵ -aminową reszty lizyny w białku (A) lub aminę pierwszorzędową (B), dzięki czemu powstaje wiązanie izopeptydowe. Akceptorem grupy acylowej może być również cząsteczka wody (C), a w rezultacie utworzona zostaje reszta kwasu glutaminowego. A – białko zawierające wolną resztę glutaminy, B – białko zawierające wolną resztę lizyny, E – enzym, R – monoamina lub poliamina.

warstwach naskórka, a poprzez N-końcowy mirystynian lub palmitynian zakotwicza się w błonie komórkowej proliferujących i różnicujących się keratynocytów (IISMAA i współaut. 2009).

Tkankowa transglutaminaza [ang. tissue (cellular) transglutaminase, TGc lub type 2 transglutaminase, TG2] często określana jest mianem „wszechobecnej”, gdyż występuje w różnorodnych tkankach i narządach. Jej obecność stwierdzono m.in. w śródbłonku ścian naczyń krwionośnych, erytrocytach, nerkach, płucach, sercu. Powoduje ona sieciowanie białek wewnątrzkomórkowych oraz zewnątrzkomórkowych. TG2 jest odpowiedzialna za pełnienie wielu funkcji, takich jak: integralność tkanek, różnicowanie i apoptoza komórek czy też stabilizacja macierzy zewnątrzkomórkowej. Można stwierdzić, że TG2 jest wielofunkcyjnym białkiem i jedno-

cznie bifunkcyjnym enzymem, gdyż oprócz aktywności transamidacyjnej, bierze udział w także w przekazywaniu sygnałów komórkowych. Przekazywanie sygnały przez tkankową transglutaminazę jest możliwe dzięki temu, że jest ona identyczna do białka $G\alpha$, przez co uczestniczy w aktywacji fosfolipazy C przez receptory adrenergiczne alfa1B i alfa1D (MATUSIEWICZ i MATUSIEWICZ 2004, SANE i współaut. 2007).

Kolejnym enzymem z tej grupy jest **naszkórkowa transglutaminaza** (ang. epidermal transglutaminase, TGe lub type 3 transglutaminase, TG3), która zaangażowana jest w proces sieciowania białek, takich jak: lorikryna, inwolukryna, cystatyna α , dzięki czemu podobnie jak TG1 bierze udział w końcowym różnicowaniu keratynocytów. Naskórkowa transglutaminaza zlokalizowana jest w cytoplazmie keratynocytów, a produkty jej

sieciowania przemieszczane są do obwodowych części komórki, gdzie następnie ulegają reakcjom katalizowanym przez TG1. W ten sposób utworzona zostaje jednorodna, zrogowaciała warstwa naskórka. W warunkach *in vivo* synteza i aktywność TG3 ograniczona jest do ziarnistej i rogowej warstwy naskórka (WOLNIK-TRZECIAK i współaut. 2005). Ponadto, TG3 wstawia wiązania krzyżowe między białkami znajdującymi się w mieszkach włosowych, przez co określana jest często mianem „transglutaminazy mieszków włosowych”. Badania wykazały, że miejscem jej występowania są również: płuca, nerki, mózg, żołądek, jelito cienkie, jądra i mięśnie szkieletowe (IISMAA i współaut. 2009).

W gruczole krokowym zlokalizowana jest transglutaminaza gruczolu krokowego (ang. prostate transglutaminase, TGp lub type 4 transglutaminase, TG4), której rola w organizmie ludzkim nie została wyjaśniona. Badania wykazały, że u gryzoni TG4 pełni funkcję w procesie rozrodczym poprzez hamowanie odpowiedzi immunologicznej, natomiast w żeńskich narządach rozrodczych wykazuje działanie plemnikobójcze (ABLIN i współaut. 2011).

Transglutaminaza X (ang. transglutaminase X, Tgx lub type 5 transglutaminase, TG5) znajduje się w dwóch warstwach komórek naskórka: ziarnistej oraz kolczystej. Biologiczna rola aktywnej formy TG5 polega na

sieciowaniu białek epidermalnych, takich jak: keratyna, wimentyna, tubulina, dzięki czemu bierze udział w różnicowaniu komórek naskórka. Ekspresja TG5 odkryta została również w łożysku, macicy, jajnikach, gruczole sutkowym (WOLNIK-TRZECIAK i współaut. 2005).

Transglutaminaza Y (ang. transglutaminase Y, TGy lub type 6 transglutaminase, TG6) oraz transglutaminaza Z (ang. transglutaminase Z, TGz lub type 7 transglutaminase, TG7) są najpóźniej odkrytymi enzymami należącymi do tej rodziny, dlatego jak na razie niewiele wiadomo o miejscu ich występowania czy spełnianych przez nie funkcjach (GRIFFIN i współaut. 2002).

Ze względu na katalizowane reakcje sieciowania białek transglutaminazy znalazły zastosowanie w medycynie oraz przemyśle spożywczym i kosmetycznym. Transglutaminazy są stosowane jako biokatalizatory w przemyśle tekstylnym, kosmetycznym i spożywczym. Dzięki zdolności tworzenia wiązań poprzecznych między białkami, stosuje się je do poprawy jakości produktów spożywczych, takich jak: makarony, pieczywo, mięso, nabiał, ryby. Dodatek transglutaminaz do tych produktów poprawia ich wygląd, smak, zapach, konsystencję, a ponadto przedłuża ich trwałość oraz obniża stężenie substancji wywołujących reakcje alergiczne (KURASHI i współaut. 2001).

CZYNNIK XIII KRZEPNIĘCIA

Niezwykle ważnym enzymem należącym do rodziny transglutaminaz jest czynnik XIII. Aktywny FXIII zaangażowany jest w sieciowanie licznych białek układu krzepnięcia i fibrynolizy, białek adhezyjnych czy też białek cytoszkieletu (MUSZBEK i współaut. 1999).

Najważniejszą jego funkcją jest zaangażowanie w ostatni etap kaskady krzepnięcia krwi, czyli stabilizowanie polimerów utworzonej z fibrynogenu fibryny (sieciowanie fibryny) poprzez wstawianie wiązań kowalencyjnych. W rezultacie następuje wzmocnienie właściwości mechanicznych skrzepu (STANDEVEN i współaut. 2005, FALVO i współaut. 2010). Czynnik XIII powoduje sieciowanie jedynie łańcuchów α i γ fibryny, natomiast łańcuchy β nie biorą udziału w tej reakcji. W pierwszym etapie dochodzi do szybkiego utworzenia przez FXIII wiązań krzyżowego γ -glutamyl- ϵ -lizynowego pomiędzy resztą Lys406 jednego łańcucha γ a resztą Glu398

lub Glu399 innego łańcucha γ (powstawanie dimerów γ - γ). Następnie zachodzi znacznie wolniejszy proces sieciowania łańcuchów α fibryny, w którym zaangażowane są liczne reszty glutaminy i lizyny (w rezultacie w obrazie elektroforetycznym włókniaka pojawiają się obok dimerów γ - γ , oligomery i polimery łańcuchów α). Produktem sieciowania fibryny przez czynnik XIII mogą być także heterodimery α - γ , jak również trimery i tetramery łańcuchów γ (CLEARY i MAURER 2006, MUSZBEK i współaut. 2008). Ponadto, czynnik XIII jest niezbędny w procesie gojenia się ran, w angiogenezie czy też w stabilizacji i mineralizacji zewnątrzkomórkowej macierzy w kościach i chrząstkach. Istnieją dwie formy czynnika XIII: osoczowa (ang. plasma FXIII, FXIII-A₂B₂ lub pFXIII) i komórkowa (ang. cellular FXIII, FXIII-A₂ lub cFXIII) (HSIEH i NUGENT 2008).

Osoczowy czynnik XIII jest heterotetramerycznym białkiem o masie około 320 kDa, zbudowanym z dwóch katalitycznych podjednostek A (FXIII-A) wykazujących cechy transglutaminazy i dwóch regulatorowych podjednostek B (FXIII-B) o m.cz. odpowiednio 83 i 80 kDa i ogólnym wzorze A_2B_2 (LORAND 2001). Obecna w płytkach, megakariocytach, monocytach komórkowa forma czynnika XIII ma charakter dimeru A_2 . Podjednostki A czynnika XIII są globularnymi białkami, które w osoczowej formie FXIII otoczone są przez dwie długie, cienkie i elastyczne podjednostki B (SARVARY i współaut. 2004, KOMAROMI i współaut. 2011). Miejscem syntezy FXIII są przede wszystkim komórki szpiku kostnego, a ponadto monocyty, makrofagi, megakariocyty, hepatocyty, chondrocyty, osteoblasty (SARVARY i współaut. 2004, KORTE 2010). Podjednostka A kodowana jest przez zlokalizowany na chromosomie 6 gen *F13A1*, który składa się z 15 egzonów i 14 intronów. Charakterystyczny w budowie podjednostki A czynnika XIII jest N-końcowy peptyd aktywacyjny (ang. activation peptide FXIII, AP-FXIII), obejmujący 37 pierwszych aminokwasów, który u większości enzymów z rodziny transglutaminaz nie występuje. Kolejne domeny są typowe dla pozostałych enzymów z tej rodziny. Domena rdzeniowa odgrywa zasadniczą rolę w aktywacji FXIII, ponieważ obejmuje ona centrum aktywne utworzone przez triadę katalityczną złożoną z 3 reszt aminokwasowych: Cys314, His373 i Asp396 oraz niezbędną w stabilizowaniu produktu pośredniego reakcji resztę Trp279 (KOMAROMI i współaut. 2011). Ponadto, łańcuchy boczne aminokwasów wchodzących w skład domeny rdzeniowej: Asn436, Asp438, Glu485, Glu490 oraz grupa karbonylowa Ala457 stanowią miejsce wiązania jonów Ca^{2+} niezbędnych do aktywacji FXIII (KRISTIANSEN i ANDERSEN 2011). Zaangażowana w reakcję z substratem glutaminowym reszta Cys314 znajduje się w zagłębieniu domeny katalitycznej, a w nieaktywnej konformacji FXIII chroniona jest przed kontaktem z reagentami przez peptyd aktywacyjny oraz znajdującą się w obrębie domeny β -beczułki 1 resztę Tyr560. Mostek solny powstający pomiędzy resztami Asp343 i Arg11 przeciwnego mono-

meru zapewnia bowiem odpowiednią lokalizację AP-FXIII, dzięki której centrum aktywne FXIII jest zasłonięte. Reakcji FXIII-A z substratami zapobiega także wiązanie utworzone między atomem tlenu Tyr560 a atomem siarki Cys314. Usunięcie AP-FXIII oraz przemieszczenie domeny β -beczułki 1 jest więc niezbędne do uzyskania aktywnej formy enzymu. Pomimo że aktywny czynnik XIII zawsze występuje w formie dimeru FXIII- A_2 , nadal nie wiadomo, które elementy strukturalne odpowiedzialne są za utrzymanie związanych ze sobą monomerów. Przypuszcza się, że wiązanie pomiędzy resztami Arg260 i Asp404 przeciwnego monomeru może być istotne w dimeryzacji, ale konieczne są dalsze badania w celu wyjaśnienia tego procesu (KOMAROMI i współaut. 2011). Podjednostka B czynnika XIII jest glikoproteiną syntetyzowaną i wydzielaną do osocza przez hepatocyty. Dojrzałe białko składa się z 641 aa i jest połączone z węglowodanami, które stanowią 8,5% jego masy (MUSZBEK i współaut. 2011). Podjednostka B kodowana jest przez zlokalizowany na chromosomie 1 gen *F13B*, który zawiera 12 egzonów i 11 intronów (BISWAS i współaut. 2011). Podjednostka ta jest typowym białkiem mozaikowym, które składa się z dziesięciu tzw. domen sushi, z których każda liczy około 60 aminokwasów. Drugorzędowa struktura β tych domen stabilizowana jest przez dwa mostki disiarczkowe. Tworzone są one przez wiązania disiarczkowe pomiędzy pierwszą a trzecią oraz drugą a czwartą resztą cysteiny w domenie (KOMAROMI i współaut. 2011). Podjednostka B występuje w postaci homodimeru FXIII- B_2 , a za montaż dwóch monomerów odpowiedzialne są czwarta i dziewiąta domena sushi. Pierwsza domena sushi jest z kolei potrzebna do utworzenia heterotetrameru z podjednostkami A czynnika XIII, które chronione są przez FXIII- B_2 przed aktywacją i proteolityczną degradacją. W obrębie FXIII-A nie odkryto elementów strukturalnych odpowiedzialnych za tworzenie tetramerycznego białka. Ponadto niewykluczone jest, że pozostałe domeny sushi w FXIII-B są także zaangażowane w montaż homodimeru czy heterotetrameru (SOURI i współaut. 2008).

MECHANIZMY AKTYWACJI CZYNNIKA XIII

W obecności trombiny i Ca^{2+} osoczowy FXIII ulega aktywacji podczas końcowego

etapu krzepnięcia krwi, ponieważ jego aktywna forma jest niezbędna do utworzenia

skrzepu fibrynowego. Początkowo, trombina hydrolizuje wiązanie peptydowe FXIII w pozycji Arg37-Gly38, a w wyniku tego AP-FXIII ulega proteolitycznemu odszczepieniu od cząsteczki macierzystej. Odłączenie peptydu aktywacyjnego przez trombinę osłabia interakcje pomiędzy podjednostkami A i B, dlatego w obecności jonów wapnia i fibryny, hamujący aktywność enzymatyczną dimer FXIII-B₂ zostaje oddysocjowany od FXIII-A₂ (KOMAROMI i współaut. 2011). Podjednostki A FXIII (ang. inactive intermediate after thrombin cleavage, FXIII-A') ulegają jednocześnie konformacyjnej zmianie do formy ak-

tywnej (ang. activated FXIII, FXIII-A₂*), dzięki czemu centrum aktywne enzymu zostaje odsłonięte i udostępnione dla substratów. Istotne jest, że uwolnienie AP-FXIII tylko z jednej podjednostki A jest wystarczające dla wywołania przez jony Ca²⁺ pełnej aktywności transglutaminazy (MUSZBEK i współaut. 2008). Ponadto fibryna (lub fibrynogen) moduluje stężenie jonów Ca²⁺ niezbędnych do aktywacji FXIII-A', gdyż obniża je z powyżej 10 mmol/L do fizjologicznego stężenia obecnego w osoczu, które wynosi około 1,5 mmol/L (LORAND 2001).

REAKCJE KATALIZOWANE PRZEZ ZAKTYWOWANY CZYNNIK XIII

Zaktywowany czynnik XIII krzepnięcia krwi katalizuje reakcje transferu grupy acylowej, której donorem jest peptyd obdarzony resztą glutaminową, natomiast akceptor stanowi pierwszorzędowa grupa aminowa w różnych związkach. Podobnie jak proces transacylacji przebiegający z udziałem innych transglutaminaz, reakcja katalizowana przez FXIII również przebiega dwuetapowo. W pierwszym etapie dochodzi do utworzenia wiązania tioestrowego pomiędzy grupą tiolową reszty Cys314 w aktywnym FXIII a grupą γ -karboksamidową reszty glutaminy, przez co utworzony zostaje produkt pośredni reakcji tzw. acyloenzym (BAGOLY i współaut. 2012). Produktem ubocznym jest natomiast uwalniający się amoniak, który wskazuje na nieodwracalny charakter tej reakcji. W drugim etapie, analogicznie jak w przypadku działania innych transglutaminaz (co zostało opisane na początku pracy), dochodzi do wytworzenia wiązania izopeptydowego. W czasie przebiegu tych reakcji centrum aktywne czynnika XIII zostaje zregenerowane, dlatego uwolniony enzym może znów katalizować kolejne przemiany (BERECZKY i współaut. 2003).

Aktywność FXIII może być regulowana przez różne niespecyficzne inhibitory. Jednym z nich jest tlenek azotu (NO), który reaguje z grupą tiolową reszty cysteiny, co przyczynia się do zahamowania aktywności tego enzymu (BERNASSOLA i współaut. 1999, CATANI i współaut. 1998). Hamowanie tej zależnej od jonów Ca²⁺ transglutaminazy cysteinowej może odbywać się także przez substancje alkilujące, m.in. jodoacetamid, czy też przez substancje chelatujące, np. EDTA (FINNEY i współaut. 1997). Specyficznymi inhibitorami FXIII są także: przeciwgrzybiczny antybiotyk - cerulenina, jak również syntetyczne peptydy posiadające sekwencje charakterystyczną dla FXIII w pozycjach: Asn72-Asp97 i Asp190-Phe230 (ACHYUTHAN i współaut. 1993). Ponadto, aktywność enzymatyczna czynnika XIII może być hamowana przez specyficzne przeciwciała, np. przeciwciała monoklonalne 9C11, a także produkowany w gruczołach ślinowych pijawki amazońskiej (*Haementeria ghilianii*) tridegin, który jest najsilniejszym z dotychczas poznanych inhibitorów czynnika XIII (FINNEY i współaut. 1997).

POLIMORFIZMY CZYNNIKA XIII

Badanie polimorfizmów czynnika XIII oraz ustalenie ich klinicznego znaczenia stało się niezwykle inspirującym przedmiotem dociekań wielu naukowców.

Podjednostka A czynnika XIII jest polimorficznym białkiem, które obejmuje siedem poznanych do tej pory polimorfizmów:

Val34Leu, Tyr204Phe, Thr550Ile, Leu564Pro, Leu588Gln, Val650Ile oraz Glu651Gln (MUSZBEK i współaut. 2011). Wśród nich najlepiej zbadany został efekt substytucji Leu w pozycję Val34 peptydu aktywacyjnego, która wykazuje znaczną heterogenność etniczną. Allel Leu34 najczęściej występuje u ludzi rasy bia-

lej, mniej powszechny jest wśród rasy czarnej, a zdecydowanie najrzadziej spotykany jest u Azjatów. Obecność polimorfizmu Val34Leu w odległości trzech aminokwasów od miejsca proteolitycznego cięcia przez trombinę wpływa na szybkość hydrolizy peptydu aktywacyjnego od pozostałej części FXIII. W konsekwencji, aktywacja czynnika XIII zawierającego leucynę w pozycji 34 przebiega 2,5-krotnie szybciej w porównaniu z wariantem Val34, co przekłada się na szybsze sieciowanie fibryny (MUSZBEK i współaut. 2010, SHEMIRANI i współaut. 2006). Polimorfizm Val34Leu ma także znaczący wpływ na strukturę skrzepu fibrynowego. W obecności wysokiego stężenia fibrynogenu, skrzep tworzony w osoczu homozygot względem allelu Leu34 charakteryzuje się grubszymi włóknami fibrynowymi, luźniej upakowaną strukturą oraz zwiększoną przenikalnością niż skrzepy powstałe w osoczu homozygot zawierających Val34. W przypadku heterozygot Val34/Leu34 cechy utworzonej sieci fibrynowej są pośrednie. Skrzepy posiadające grubsze włókna i większą przenikalność są bardziej podatne na proces fibrylizacji w porównaniu do cienkich i ściśle upakowanych włókien o nieznacznej przenikalności. Dzięki

temu obecność polimorfizmu Val34Leu może mieć ochronny efekt zapobiegający niektórym chorobom związanym z zaburzeniem hemostazy i zaleganiem skrzepów w naczyniach krwionośnych. Badania prowadzone w tym kierunku wskazują, że polimorfizm Val34Leu może ograniczyć ryzyko m.in. zawału mięśnia sercowego, choroby wieńcowej czy żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej. Ze względu na doniesienia także sprzeczne do powyższych potrzeba jeszcze wielu badań dla potwierdzenia tej hipotezy. Niewiele wiadomo natomiast na temat biochemii pozostałych polimorfizmów FXIII-A, a wszelkie wstępne doniesienia wymagają jeszcze wielu eksperymentów dla ich potwierdzenia (KOBBERVIG i WILLIAMS 2004, MUSZBEK i współaut. 2010). Podjednostka B FXIII obejmuje natomiast trzy polimorficzne warianty: Arg95His, His330Arg, Asp549Glu. Nieliczne informacje dotyczą jedynie polimorfizmu Arg95His, który przyspiesza dysocjację podjednostek po aktywacji FXIII przez trombinę. Biochemiczne konsekwencje tych polimorfizmów również nie zostały do tej pory wyjaśnione, dlatego stanowią inspirujące zadanie dla przyszłych badań naukowych (MUSZBEK i współaut. 2011).

CZYNNIK XIII KRZEPNIĘCIA KRWI JAKO SPECYFICZNA TRANSGLUTAMINAZA

Streszczenie

Transglutaminazy (E.C. 2.3.2.13) stanowią grupę blisko spokrewnionych ze sobą enzymów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania wielu organizmów. Transglutaminazy biorą udział w licznych procesach fizjologicznych np. krzepnięcie krwi, gojenie się ran, różnicowanie komórek, czy też apoptoza komórek. Najważniejszą biologiczną funkcją transglutaminaz jest katalizowanie nieodwracalnych, potranslacyjnych modyfikacji białek polegających na utworzeniu wiązania izopeptydowego między pierwszorzędowną grupą aminową substratu, a resztą glutaminy łańcucha polipeptydowego. Niezwykle ważnym enzymem należącym do rodziny transglutaminaz jest czynnik XIII krzepnięcia krwi. FXIII jest zaangażowany w ostatni etap kaskady krzepnięcia krwi czyli stabilizowanie polimerów utworzonej z fibrynogenu

fibryny poprzez wstawianie wiązań kowalencyjnych. W rezultacie następuje wzmocnienie właściwości mechanicznych skrzepu. Istnieją dwie formy czynnika XIII: osoczowa i komórkowa. Obecny w osoczu czynnik XIII jest tetramerycznym białkiem, składającym się z dwóch katalitycznych podjednostek A oraz dwóch podjednostek B pełniących funkcję regulatorowe. Komórkowa forma czynnika XIII jest natomiast homodimerem zbudowanym tylko z dwóch podjednostek A i występuje w cytoplazmie monocytów, makrofagów, megakariocytów, płytek krwi, chondrocytów, osteoblastów oraz w łożysku. Celem tej pracy jest krótka charakterystyka transglutaminazy, opisanie mechanizmów ich działania jak również przedstawienie czynnika XIII jako specyficznego enzymu należącego do tej grupy.

FACTOR XIII AS A SPECIFIC TRANSGLUTAMINASE

Summary

Transglutaminases (EC 2.3.2.13) are a group of closely related enzymes necessary for the proper functioning of many organisms. Transglutaminases are involved in many physiological processes such as blood clotting, wound healing, cell differentiation and apoptosis. The most important biological func-

tion of transglutaminase is irreversible posttranslational modification of proteins consisting of forming isopeptide bond between the primary amino group of the substrate, and the glutamine rest of the polypeptide chain. A very important enzyme belonging to the transglutaminase family is blood coagulation

factor XIII. FXIII is involved in the final stage of the blood coagulation cascade that is stabilization of fibrin polymers formed from fibrinogen by inserting covalent bonds. What strengthen mechanical properties of the formed clot. There are two forms of factor XIII: plasmatic and cellular. Factor XIII present in the plasma is a tetrameric protein composed of two catalytic subunits A and two B subunits having regulatory function. The cellular form of factor

XIII is a homodimer built of two subunits A which occurs in the cytoplasm of monocytes, macrophages, megakaryocytes, platelets, chondrocytes, osteoblasts, and in the placenta. The aim of this paper is a short characteristic of transglutaminases, description of the mechanisms of their action with particular emphasis on factor XIII as a specific enzyme belonging to this group.

LITERATURA

- ABLIN R. J., KYNASTON H. G., MASON M. D., JIANG W. G., 2011. *Prostate transglutaminase (TGase-4) antagonizes the anti-tumour action of MDA-7/IL-24 in prostate cancer*. J. Transl. Med. 9, 49.
- ACHYUTHAN K. E., SLAUGHTER T. F., SANTIAGO M. A., ENGHILD J. J., GREENBERG C. S., 1993. *Factor XII-Ia-derived peptides inhibit transglutaminase activity. Localization of substrate recognition sites*. J. Biol. Chem. 268, 21284-21292.
- BAGOLY Z., KONCZ Z., HARSFALVI J., MUSZBEK L., 2012. *Factor XIII, clot structure, thrombosis*. Thromb. Res. 129, 382-387.
- BERECZKY Z., KATONA E., MUSZBEK L., 2003. *Fibrin stabilization (factor XIII), fibrin structure and thrombosis*. Pathophysiol. Haemost. Thromb. 33, 430-437.
- BERNASSOLA F., ROSSI A., MELINO G., 1999. *Regulation of transglutaminases by nitric oxide*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 887, 83-91.
- BISWAS A., IVASKEVICIUS V., SEITZ R., THOMAS A., OLDENBURG J., 2011. *An update of the mutation profile of Factor 13 A and B genes*. Blood Rev. 25, 193-204.
- CATANI M. V., BERNASSOLA F., ROSSI A., MELINO G., 1998. *Inhibition of clotting factor XIII activity by nitric oxide*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 249, 275-278.
- CLARKE D. D., MYCEK M. J., NEIDLE A., WAELSCH H., 1959. *The incorporation of amines into protein*. Arch. Biochem. Biophys. 79, 338-354.
- CLEARY D. B., MAURER M. C., 2006. *Characterizing the specificity of activated Factor XIII for glutamine-containing substrate peptides*. Biochim. Biophys. Acta 1764, 1207-1217.
- DUCKERT F., JUNG E., SHMERLING D. H., 1960. *A hitherto undescribed congenital haemorrhagic diathesis probably due to fibrin stabilizing factor deficiency*. Thromb. Diath. Haemorrh. 5, 179-186.
- FALVO M. R., GORKUN O. V., LORD S. T., 2010. *The molecular origins of the mechanical properties of fibrin*. Biophys. Chem. 152, 15-20.
- FINNEY S., SEALE L., SAWYER R. T., WALLIS R. B., 1997. *Tridegin, a new peptidic inhibitor of factor XII-Ia, from the blood-sucking leech Haementeria ghilianii*. Biochem. J. 324, 797-805.
- GRIFFIN M., CASADIO R., BERGAMINI C. M., 2002. *Transglutaminases: nature's biological glues*. Biochem. J. 368, 377-396.
- HSIEH L., NUGENT D., 2008. *Factor XIII deficiency*. Haemophilia. 14, 1190-1200.
- IISMAA S. E., MEARNS B. M., LORAND L., GRAHAM R. M., 2009. *Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders*. Physiol. Rev. 89, 991-1023.
- KOBBERVIG C., WILLIAMS E., 2004. *FXIII polymorphisms, fibrin clot structure and thrombotic risk*. Biophys. Chem. 112, 223-228.
- KOMAROMI I., BAGOLY Z., MUSZBEK L., 2011. *Factor XIII: novel structural and functional aspects*. J. Thromb. Haemost. 9, 9-20.
- KORTE W., 2010. *F. XIII in perioperative coagulation management*. Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol. 24, 85-93.
- KRISTIANSEN G. K., ANDERSEN M. D., 2011. *Reversible activation of cellular factor XIII by calcium*. J. Biol. Chem. 286, 9833-9839.
- KURAIISHI C., YAMAZAKI K., SUSA Y., 2001. *Transglutaminase: its utilization in the food industry*. Food. Rev. Int. 17, 221-246.
- LAKI K., LORAND L., 1948. *On the Solubility of Fibrin Clots*. Science 108, 280-?.
- LORAND L., 2001. *Factor XIII: structure, activation, and interactions with fibrinogen and fibrin*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 936, 291-311.
- MARTIN A., DE VINO G., GENTILE V., 2011. *Possible role of the transglutaminases in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases*. Int J Alzheimers. Dis. 865432.
- MATUSIEWICZ M., MATUSIEWICZ K., 2004. *Znaczenie transglutaminazy tkankowej w fizjologii i patologii*. Adv. Clin. Exp. Med. 13, 299-307.
- MUSZBEK L., YEE V. C., HEVESSY Z., 1999. *Blood coagulation factor XIII: structure and function*. Thromb. Res. 94, 271-305.
- MUSZBEK L., BAGOLY Z., BERECZKY Z., KATONA E., 2008. *The involvement of blood coagulation factor XIII in fibrinolysis and thrombosis*. Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem. 6, 190-205.
- MUSZBEK L., BERECZKY Z., BAGOLY Z., SHEMIRANI A. H., KATONA E., 2010. *Factor XIII and atherothrombotic diseases*. Semin. Thromb. Hemost. 36, 18-33.
- MUSZBEK L., BERECZKY Z., BAGOLY Z., KOMAROMI I., KATONA E., 2011. *Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions*. Physiol. Rev. 91, 931-972.
- RICOTTA M., IANNUZZI M., VIVO G. D., GENTILE V., 2010. *Physio-pathological roles of transglutaminase-catalyzed reactions*. World J. Biol. Chem. 1, 181-187.
- ROBBINS K. C., 1944. *A study on the conversion of fibrinogen to fibrin*. Am. J. Physiol. 142, 581-588.
- SAMELAK A., SOBIESZCZUK-NOWICKA E., LEGOCKA J., 2010. *Transglutaminazy i ich biologiczne funkcje*. Post. Biol. Kom. 37, 599-612.
- SANE D. C., KONTOS J. L., GREENBERG C. S., 2007. *Roles of transglutaminases in cardiac and vascular diseases*. Front Biosci. 12, 2530-2545.
- SARVARY A., SZUCS S., BALOGH I., BECKY A., BARDOS H., KAVAI M., SELIGSOHN U., EGBRING R., LOPACIUK S., MUSZBEK L., ADANY R., 2004. *Possible role of factor XIII subunit A in Fc gamma and complement receptor-mediated phagocytosis*. Cell Immunol. 228, 81-90.
- SHEMIRANI A. H., HARAMURA G., BAGOLY Z., MUSZBEK L., 2006. *The combined effect of fibrin formation and factor XIII A subunit Val34Leu polymorphism on the activation of factor XIII in whole plasma*. Biochim. Biophys. Acta 1764, 1420-1423.

- SOURI M., KAETSU H., ICHINOSE A., 2008. *Sushi domains in the B subunit of factor XIII responsible for oligomer assembly*. *Biochemistry* 47, 8656-8664.
- STANDEVEN K. F., ARIENS R. A., GRANT P. J., 2005. *The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function*. *Blood Rev.* 19, 275-288.
- WOLNIK-TRZECIAK G., BOWSZYC-DMOCHOWSKA M., DAŃCZAK-PAZDROWSKA A., DMOCHOWSKI M., 2005. *Budowa i czynności transglutaminaz oraz ich rola w opryszczkowatym zapaleniu skóry*. *Derm. Klin.* 7, 599-612.