

Metaloproteaza ADAMTS13 w patogenezie schorzeń zakrzepowo-zatorowych

ADAMTS13 metalloprotease in the pathogenesis of thromboembolic disorders

Małgorzata Witoń¹, Joanna Gleńska-Olender¹, Iwona Gorczyca-Michta², Katarzyna Mazurek¹,
Karolina Niebudek¹, Beata Wożakowska-Kapłon¹⁻³

¹Regionalne Centrum Naukowo-Technologiczne w Podzamczu, Biobank Świętokrzyski

²Klinika Kardiologii i Elektroterapii Świętokrzyskiego Centrum Kardiologii w Kielcach

³Wydział Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach

Streszczenie

ADAMTS13, popularnie zwany białkiem rozcinającym czynnik von Willebranda (vWF), należy do rodziny białek ADAMTS – metaloproteinaz zawierających w swej budowie motyw trombospondyny. Kliniczne znaczenie regulacji wielkości multimerycznego vWF przez ADAMTS13 jest przykładem manifestacji zaburzeń osi vWF–ADAMTS13. Zmniejszenie aktywności tego enzymu skutkuje wystąpieniem wrodzonej lub nabytej zakrzepowej plamicy małopłytkowej.

Słowa kluczowe: metaloproteaza, ADAMTS13, czynnik von Willebranda

(Folia Cardiologica 2014; 9, 2: 153–156)

Wstęp

Powikłania zakrzepowo-zatorowe stanowią istotne następstwa licznych schorzeń i stanów, na przykład migotania przedsionków, stanów zapalnych czy unieruchomienia. Wiele procesów zaangażowanych w koordynowanie homeostazy organizmu polega na reakcji proteolitycznej, podczas której enzym łączy się ze specyficznym dla siebie substratem. Właściwe wiązanie enzym–substrat prowadzi do aktywacji, inaktywacji lub rozprzestrzenienia się procesu biochemicznego. Kontrola reakcji proteolitycznej jest kompleksowa i w szerokim ujęciu obejmuje oddziaływanie proteazy oraz substratu, wiązanie kofaktorów reakcji oraz pośrednie lub bezpośrednie inaktywowanie proteazy w celu zakończenia jej aktywności.

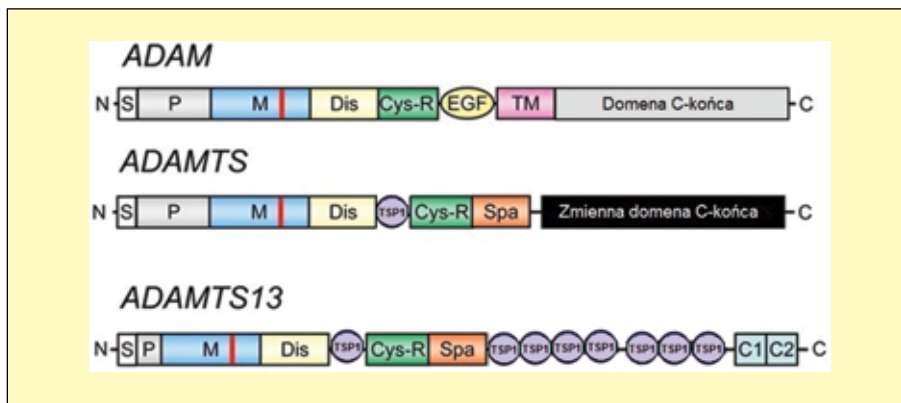
ADAM – białka zawierające domenę dezintegryny i metaloproteinazy

Białka ADAM (*a disintegrin-like and metalloproteinase*) to rodzina transbłonowych białek powierzchni komórkowej, które

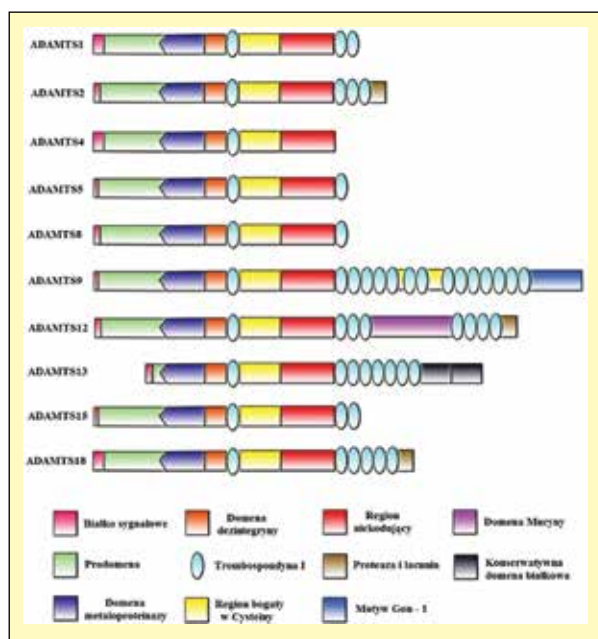
wykazują zarówno działania adhezyjne, jak i proteolityczne. Termin „dezintegryna” jest zarezerwowany dla określonych toksyn jadu węża, a termin „białko typu dezintegryny” – dla białek z motywem RGD z podobnymi właściwościami, ale inną ogólną budową. Do białek typu dezintegryny należą między innymi ADAM i ADAMTS (ADAM z motywami trombospondyny). Białka te tworzą jedną rodzinę adamalizyn, która wraz z metaloproteinazami należy do nadrodziny metyzyn [1].

Białka ADAMTS

Podrodziną ADAM są białka, w których budowie pojawia się dodatkowo motyw trombospondyny (ryc. 1) i stąd ich nazwa „ADAMTS” (*A Disintegrin-like And Metalloprotease with Thrombospondin motifs*) [2]. Cechą charakterystyczną rodziny białek ADAMTS jest posiadanie jednej lub więcej domeny z motywem trombospondyny (TSP) w regionie pomocniczym. Wszystkie białka z rodziny ADAMTS są zbudowane w podobny sposób, zaczynając od N-końca, zawierają: peptyd sygnałowy, prodomenę utrzymującą enzym w uśpieniu – z wyjątkiem ADAMTS9 i ADAMTS13, domenę wiążącą cynk, domenę



Rycina 1. Diagram przedstawiający strukturę ADAM, ADAMTS i ADAMTS 13 (zmodyfikowano na podstawie [4]); S – białko sygnałowe; P – propeptyd; M – metaloproteaza z zaznaczonym na czerwono miejscem wiążącym cynk; Dis – dezintegryna; Cys-R – domena bogata w cysteinę; EGF (*endothelial growth factor*) – endotelialny czynnik wzrostu; TM (*transmembrane domain*) – domena transbłonowa TSP1 – trombospondyna 1; Spa (*spacer region*) – region niekodujący; C1 i C2 – konserwatywna domena białkowa



Rycina 2. Budowa białek z rodziny ADAMTS (zmodyfikowano na podstawie [3])

dezintegryny, centralny motyw TSP, region bogaty w cysteinę, region niekodujący (*spacer region*) oraz zmienną liczbę powtórzeń motywu trombospondyny TSP w C-końcowym odcinku białka (ryc. 2). Białka należące do danej rodziny różnią się liczbą oraz typem domen. Wśród protein ADAMTS można wyróżnić podgrupy pod względem pełnionych w organizmie funkcji, tj.: przetwarzania prokolagenu (ADAMTS2, ADAMTS3, ADAMTS14), degradacji proteoglikanu (ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5, ADAMTS8, ADAMTS9, ADAMTS15 i ADAMTS20), krzepliwości krwi (ADAMTS13) oraz degradacji białka macierzy (ADAMTS7, ADAMTS12). Funkcja niektórych białek (ADAMTS6, ADAMTS16, ADAMTS17, ADAMTS18, ADAMTS19) wciąż nie jest poznana [3].

ADAMTS13 – budowa i funkcja

Powszechnie zwany białkiem rozcinającym czynnik von Willebranda (vWF, *von Willebrand factor*) ADAMTS13 jest unikatowym członkiem rodziny ADAMTS ze względu na brak przynależności do którejkolwiek z subgrup. Propeptyd ten jest zbudowany z 41 aminokwasów (ryc. 1). Dla porównania, domena ta w pozostałych białkach rodziny ADAM i ADAMTS jest znacznie dłuższa, obejmując w przybliżeniu 200 reszt aminokwasowych. Utrata propeptydu nie wpływa na sekrecję ani nie zaburza aktywności enzymu [4, 5]. Domeny katalityczne proteinaz ADAMTS charakteryzują się wysokim stopniem podobieństwa i zawierają wysoce konserwatywny motyw HEXHXXGXXHD, w którym znajdują się trzy reszty histydyny (H) odpowiedzialne za wiązanie z katalitycznym jonem cynku; „X” oznacza dowolną resztę aminokwasową [4]. W domenie katalitycznej znajdują się także strukturalny jon cynku i przede wszystkim trzy jony wapnia, które stabilizują strukturę enzymu. W badaniach, w których wykorzystywano zrekombinowane białko ADAMTS13 (charakteryzujące się skróconą domeną C-końcową) wykazano, że sama domena wiążąca cynk nie była w stanie rozszczepiać vWF znajdującego się w osoczu [5].

W sąsiedztwie domeny metaloproteazy występuje domena dezintegryny, która wykazuje podobieństwo do dezintegryny – białek bogatych w cysteinę, izolowanych z jadu węża. Motyw trombospondyny 1 (TSP1) występuje w każdym białku z rodziny ADAMTS. Domena bogata w cysteinę wykazuje wysoką homologię w stosunku do innych białek z rodziny ADAMTS i najczęściej zawiera 10 reszt cysteiny. Następną domeną to region niekodujący, którego długość jest zmienna zależnie od rodzaju białka. ADAMTS13 jako jedyne białko z rodziny ADAMTS zawiera dwie konserwatywne domeny białkowe CUB znajdujące się na C-końcu białka. Pozbawianie białka części dystalnej w stosunku do TSP skutkuje uzyskaniem enzymu zachowującego funkcje wiązania i rozcinania czynnika vWF, natomiast pozbawie-

nie białka fragmentu proksymalnego w stosunku do TSP skutkuje utratą jego aktywności [6, 7].

Po raz pierwszy białko ADAMTS13 wyizolowano z ludzkiego osocza. Syntetyzowane jest natomiast głównie w wątrobie; komórki gwiazdźiste wątroby są uważane za główne źródło ADAMTS13 w osoczu [8, 9]. Inne formy białka znaleziono w łożysku, mózgu, gruczole prostaty oraz mięśniach szkieletowych [10]. Umiarkowana ekspresja ADAMTS13 zachodzi także w sercu, nerkach oraz jądrach [11].

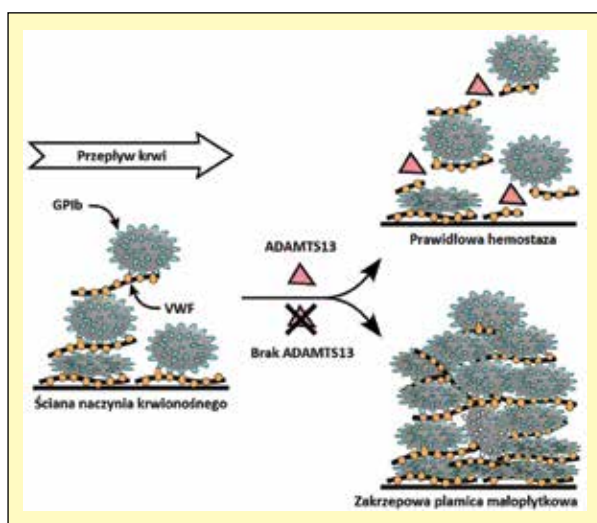
Czynnik von Willebranda jest multimeryczną glikoproteiną, która pośredniczy w adhezji płytek krwi do warstwy śródbłonkowej naczyń krwionośnych podczas uszkodzenia ściany naczynia [12]. Czynnik ten jest syntetyzowany głównie w komórkach śródbłonka naczyniowego i wydzielany do osocza jako niezwykle duże multimery vWF, które są zasadniczo zbyt duże, a tym samym zbyt reaktywne, by właściwie funkcjonować. Kontrola wielkości vWF wymaga zatem specjalnego mechanizmu regulacyjnego. Jest nim metaloproteaza osocza ADAMTS13, która powoduje rozszczepienie jednego wiązania peptydowego (Tyr1605–Met1606), znajdującego się w środkowej domenie vWF. Kliniczne znaczenie regulacji wielkości multimerycznego vWF przez ADAMTS13 jest przykładem manifestacji zaburzeń osi vWF–ADAMTS13. Zmniejszenie aktywności tego enzymu skutkuje wystąpieniem wrodzonej lub nabytej zakrzepowej plamicy małopłytkowej (TTP, *thrombotic thrombocytopenic purpura*) [13] (ryc. 3) – choroby powodowanej przez zlepianie płytek o ultradużej wielkości (UL-vWF) i manifestującej się klinicznie jako mikroangiopatywna niedokrwiistość hemolityczna oraz małopłytkowość.

Zakrzepowa plamica małopłytkowa charakteryzuje się wewnątrznaczyniowym niszczeniem komórek krwi, takich jak płytki krwi i erytrocyty, co może prowadzić do poważ-

nych powikłań, takich jak anemia, niewydolność nerek lub zaburzenia neurologiczne. Choroba ta jest spowodowana zmniejszoną aktywnością białka ADAMTS13 wynikającą z mutacji w genie ADAMTS13 lub produkcją autoprzeciwciał przeciwko ADAMTS13 [14]. Dodatkowo uznaje się, że vWF jest ważnym biomarkerem uszkodzenia śródbłonka naczyń krwionośnych. W związku z tym obserwuje się jego podwyższone stężenie w surowicy w przebiegu schorzeń o podłożu zapalnym i miażdżycowym. Stwierdzono również związek między stężeniem vWF a klinicznymi czynnikami ryzyka udaru lub incydentów naczyniowych u chorych z migotaniem przedsionków, nieprzyjmujących doustnych leków antykoagulacyjnych lub pacjentów niedostatecznie leczonych przeciwzakrzepowo. Uważa się, że obecność hiperreaktywnych multimerów UL-vWF w osoczu, z powodu niedoboru ADAMTS13, może być związana z podwyższonym ryzykiem zakrzepicy tętniczej związanej z chorobą wieńcowa [16].

U człowieka gen ADAMTS13 jest zlokalizowany na chromosomie 9 (9q34.2); obejmuje 37 kilo par zasad oraz 29 eksonów i koduje białko o masie molekularnej około 150 kDa [13]. Wiadomo, że gen ten podlega alternatywnemu składaniu, prowadząc do powstania krótszych form białka [10, 16]. Domeny C-końca mają kluczowe znaczenie w powinowactwie do substratu oraz zdolności jego rozcinania [17]. Mutacje w genie ADAMTS13 mogą prowadzić do zmniejszonej lub upośledzonej syntezy oraz sekrecji białka, jak również upośledzenia jego właściwości proteolitycznych. Zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu białka zależą od lokalizacji mutacji w kodującym go genie [5, 18]. Dwie mutacje zmieniające ramkę odczytu zidentyfikowano w egzonach 19 i 27, a jedną splicę mutację stwierdzono w intronie 13. Pozostałe dziewięć mutacji skutkowało substytucją aminokwasową (H96D, R102C, T196I, R398H, R528G, R692C, C951G, C1024G i C1213Y). Ponadto zidentyfikowano siedem polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP, single nucleotide polymorphism) związanych z substytucją aminokwasową (R7W, Q448E, P618A, R625H, A732V, A900V i A1033T) w 92 niezależnych próbkach DNA z grupy kontrolnej [19].

Sugeruje się udział vWF w patogenezie schorzeń naczyń krwionośnych (głównie zakrzepowo-zatorowych). W badaniach wykazano związek vWF z inicjowaniem powstawania blaszki miażdżycowej. Z biologicznego punktu widzenia jest prawdopodobne, że vWF przyczynia się do patogenezy wczesnych zmian miażdżycowych, dlatego w wielu pracach badano związek między stężeniem vWF w osoczu a późniejszym ryzykiem wystąpienia chorób układu sercowo-naczyniowego [20, 21]. Niskie stężenie ADAMTS13 oraz wysokie stężenie vWF w osoczu wiąże się z udarem niedokrwiennym oraz zawałem serca [22]. Znajomość niektórych aspektów katalizy ADAMTS13 i charakter modyfikacji aktywności ADAMTS13 w stosunku do multimerów vWF wymagają dalszego poznania.



Rycina 3. Patogeneza idiopatycznej zakrzepowej plamicy małopłytkowej spowodowanej niedoborem ADAMTS13 (zmodyfikowano na podstawie [14]); GPIb (*glycoprotein Ib*) – glikoproteina Ib; vWF (*von Willebrand factor*) – czynnik von Willebranda

Abstract

ADAMTS13, popularly known as von Willebrand cleavage protein, belongs to ADAMTS (A Disintegrin-like And Metalloprotease with Thrombospondin motifs) family. The clinical significance of multimeric VWF size regulation by ADAMTS13 is an example of the manifestation of VWF-ADAMTS13 axis disorders. Reduced activity of this enzyme results in the occurrence of thrombotic thrombocytopenic purpura.

Key wards: metalloprotease, ADAMTS13, von Willebrand factor

(Folia Cardiologica 2014; 9, 2: 153-156)

Piśmiennictwo

1. Żebrowska A., Wysoczyńska K., Waszczykowska E. Adamaliny – metaloproteazy biorące udział w patofizjologii chorób skóry. *Alerg. Astma Immun.* 2005; 10: 187–193.
2. Huang J., Bridges L.C., White J.M. Selective modulation of integrin-mediated cell migration by distinct ADAM family members. *Mol. Biol. Cell* 2005; 3: 254–259.
3. Kumar S., Rao N., Ge R. Emerging roles of ADAMTSs in angiogenesis and cancer. *Cancers* 2012; 4: 1252–1299.
4. Lancellotti S., Basso M., De Gristofaro R. Proteolytic processing of von Willebrand factor by ADAMTS13 and leukocyte proteases. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2013; 5: e2013058.
5. Zheng X., Nishio K., Majerus E.M., Sadler J.E. Cleavage of von Willebrand factor requires the spacer domain of the metalloprotease ADAMTS13. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 30 136–30 141.
6. Crawley J.T., de Groot R., Xiang Y., Luken B.M., Lane D.A. Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2011; 118: 3212–3221.
7. Xiang Y., de Groot R., Crawley J.T., Lane D.A. Mechanism of von Willebrand factor scissile bond cleavage by a disintegrin and metalloprotease with a thrombospondin type 1 motif, member 13 (ADAMTS13). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011; 108: 11 602–11 607.
8. Fujikawa K., Suzuki H., McMullen B., Chung D. Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood* 2001; 98: 1662–1666.
9. Zhou W., Inada M., Lee T.-P. i wsp. ADAMTS13 is expressed in hepatic stellate cells. *Lab. Invest.* 2005; 85: 780–788.
10. Zheng X., Chung D., Takayama T. i wsp. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 41 059–41 063.
11. Plaimauer B., Zimmermann K., Völkel D. i wsp. Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood* 2002; 100: 3626–3632.
12. Denis C., Lenting P. Von Willebrand factor: at the crossroads of bleeding and thrombosis. *Int. J. Hematol.* 2012; 95: 353–361.
13. Levy G., Nichols W., Lian E. i wsp. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001; 413: 488–494.
14. Sadler J. Von Willebrand Factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Am. Soc. Hematol.* 2008; 112: 11–18.
15. Roldan V., Marin F., Muina B. i wsp. Plasma von Willebrand factor levels are an independent risk factor for adverse events including mortality and major bleeding in anticoagulated atrial fibrillation patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011; 57: 2496–2504.
16. Shomron N., Hamasaki-Katagiri N., Hunt R. i wsp. A splice variant of ADAMTS13 is expressed in human hepatic stellate cells and cancerous tissues. *Thromb. Haemost.* 2010; 104: 531–535.
17. Gao W., Zhu J., Westfield L. i wsp. Rearranging exosites in noncatalytic domains can redirect the substrate specificity of ADAMTS proteases. *J. Biol. Chem.* 2012; 287: 26 944–26 952.
18. Shang D., Zheng X.W., Niiya M., Zheng X.L. Apical sorting of ADAMTS13 in vascular endothelial cells and Madin-Darby canine kidney cells depends on the CUB domains and their association with lipid rafts. *Blood* 2006; 108: 2207–2215.
19. Kokame K., Matsumoto M., Soejima K. i wsp. Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 11 902–11 907.
20. Saito I., Folsom A.R., Brancati F.L. i wsp. Nontraditional risk factors for coronary heart disease incidence among persons with diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Ann. Intern. Med.* 2000; 133: 81–91.
21. Spiel A.O., Gilbert J.C., Jilka B. Von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes. *Circulation* 2008; 117: 1449–1459.
22. Miyata T., Kokame K., Matsumoto M., Fujimura Y. ADAMTS13 activity and genetic mutations in Japan. *Haemostaseologie* 2013; 2: 131–137.