ACTA UNIVERSITATIS LODZIENSIS
FOLIA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA 14, 1999

Tadeusz Pietrucha, Janusz Szemraj, Krzysztof Chiżyński

GENETYCZNE UWARUNKOWANIA FUNKCJONOWANIA MECHANIZMU HEMOSTAZY W CHOROBACH UKŁADU KRĄŻENIA ROLA POLIMORFIZMU REGIONÓW PROMOTOROWYCH[1]

W pracy omówiono potencjalną rolę polimorfizmów regionu promotorowego łańcucha beta fibrynogenu oraz inhibitora typu I aktywatora plazminogenu (PAI-1) w chorobach sercowo-naczyniowych. Przedstawiono również potencjalne mechanizmy ich oddziaływania na układ hemostazy, a tym samym na zaburzenia funkcjonowania układu krążenia.

Zaburzenie prawidłowego funkcjonowania mechanizmu hemostazy odgrywa kluczową rolę w patogenezie i rozwoju wielu chorób układu krążenia [1–3]. Spowodowane jest nadmierną podażą lub niedoborem jednego, względnie kilku kluczowych białek biorących udział w tym procesie. Zależy więc ono pośrednio od regulacji ekspresji genów odpowiednich czynników krzepnięcia i/lub fibrynolizy.

Pierwszym etapem w ekspresji genu jest transkrypcja, czyli powstanie na bazie właściwego odcinka DNA mRNA dla danego białka, który z kolei służy jako matryca do biosyntezy łańcucha polipeptydowego w rybosomach znajdujących się poza obszarem jądra komórkowego.

Zapoczątkowanie procesu transkrypcji polega na związaniu się odpowiedniej polimerazy RNA z fragmentem DNA (promotorem) poprzedzającym właściwy gen. O szybkości zachodzenia tego procesu, o „sile" promotora decyduje powinowactwo polimerazy i towarzyszących jej białek (tzw. czynników transkrypcyjnych) do promotora, łatwość przechodzenia w stan kompleksu i szybkość opuszczania promotora. Zmienność genetyczna występująca w tym obszarze będzie więc miała bezpośredni wpływ na efektywność ekspresji.

[1] Praca częściowo finansowana z grantu KBN Nr 4 PO5E 021 10.

W przypadku chorób układu krążenia, takich jak zawał mięśnia sercowego i choroba niedokrwienna serca, do klasycznych czynników ryzyka (hiperlipidemia, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca) doszły nowe, wskazujące na zaburzenie mechanizmu hemostazy. Są to m. in.: wysoki poziom fibrynogenu oraz inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu (PAI-1). Nadmiar fibrynogenu sprzyja tendencji nasilania się zmian zakrzepowych w łożysku naczyniowym, a z kolei zahamowanie procesu fibrynolizy poprzez PAI-1 tendencję tę utrwala.

ZMIENNOŚĆ REGIONU PROMOTOROWEGO GENU ŁAŃCUCHA β FIBRYNOGENU

Podwyższony poziom fibrynogenu obserwowany jest u palaczy, w przypadku otyłości, ciąży, menopauzy, towarzyszy podwyższonemu poziomowi cholesterolu [4]. Jest on uznanym czynnikiem ryzyka wielu chorób układu krążenia, w tym zawału mięśnia sercowego [5, 6]. Wyjaśnienie genetycznych uwarunkowań podwyższonego poziomu fibrynogenu w osoczu pozwoliłoby, być może, na wytypowanie molekularnych czynników prognostycznych dla tego typu powikłań. Na podstawie diagnostyki molekularnej bardziej realna staje się możliwość dość precyzyjnego wyodrębniania spośród populacji osób zdrowych, grupy z podwyższonym czynnikiem ryzyka wystąpienia chorób układu krążenia. Tym samym otwierają się nowe możliwości dla odpowiednio ukierunkowanych działań profilaktycznych.

Łańcuchy α, β i γ wchodzące w skład cząsteczki fibrynogenu kodowane są przez geny tworzące klaster o długości ok. 50 k p.z. znajdujący się na długim ramieniu chromosomu 4. Biosynteza cząsteczki fibrynogenu jest więc uwarunkowana równoczesną ekspresją genów kodujących poszczególne łańcuchy. Szybkość tego procesu zależy od koordynacji i tempa biosyntezy tych łańcuchów. Najwolniej syntetyzowany jest łańcuch β [7]. Od tempa biosyntezy łańcucha β zależy więc ilość fibrynogenu wytwarzana przez wątrobę.

Struktura regionu promotorowego genu regulującego ekspresję łańcucha β została dość dobrze poznana, m. in. na przykładzie linii komórek wątrobowych HepG2. Sekwencja nukleotydowa od -89 do -76 stanowi konserwatywny element transkrypcyjny specyficzny dla wątroby, do którego wiąże się czynnik jądrowy wątroby 1 (HNF1 – ang. *hepatic nuclear factor 1*) [8]. Ekspresja cząsteczki fibrynogenu pobudzana jest również przez interleukinę 6 (IL-6) [9] (rys. 1). Fakt ten wyjaśnia, dlaczego często obserwujemy podwyższony poziom fibrynogenu u palaczy. Palenie tytoniu powoduje bowiem uwalnianie znacznych ilości IL-6 przez makrofagi w płucach [10]. Miejsce wiążące IL-6 zawiera motyw rozpoznawany także w regionach promotorowych innych genów – CTGGGA [11], znajdujący się powyżej miejsca wiążącego HNF1 (rys. 1).

Rys. 1. Lokalizacja zmienności regionu promotorowego genu łańcucha β fibrynogenu –455 G/A i –148 C/T. Najbardziej „korzystnym" wariantem dla zwiększonej ekspresji łańcucha β fibrynogenu jest układ A^{-455} i T^{-148} (na rysunku wariant dolny). Pojawienie się T w pozycji –148 zwiększa powinowactwo do IL6, która z kolei przyczynia się do zwiększenia tanskrypcji genu łańcucha β. Jeśli natomiast w regionie promotora pojawi się G^{-455} i C^{-148} (na rysunku wariant górny), wówczas zmienności te będą oddziaływać ujemnie na proces transkrypcji, a tym samym na poziom ekspresji

Zmiany w sekwencji fragmentu DNA odpowiedzialnego za oddziaływanie z interleukiną 6 mają więc bezpośredni wpływ na szybkość transkrypcji, a tym samym na poziom syntezy fibrynogenu w wątrobie. Tak się dzieje np. w przypadku występowania polimorfizmu C/T^{-148} [12]. Sekwencja zawierająca w pozycji T^{-148} zamiast C wykazuje zwiększone powinowactwo do IL-6, a tym samym powoduje zwiększoną transkrypcję genu łańcucha β fibrynogenu.

Z klinicznego punktu widzenia na uwagę zasługuje polimorfizm G/A w pozycji –455 i wspomniany już wyżej polimorfizm C/T w pozycji –148 (rys. 1). Badania przeprowadzone na ponad pięciotysięcznej populacji osób zdrowych wykazały, że podwyższony poziom fibrynogenu w osoczu połączony jest zazwyczaj z występowaniem polimorfizmu A/G regionu promotorowego łańcucha β w pozycji –455 [13–16]. W piśmiennictwie naukowym określany on również bywa jako RFLP (od ang. *restriction fragment lenght polymorfism*) Hae III. Występowanie nukleotydu A^{-455} zamiast G, powoduje zanik miejsca restrykcyjnego dla enzymu Hae III, co sprawia, że w wyniku analizy elektroforetycznej otrzymujemy fragmenty o różnej długości będące wynikiem trawienia tym enzymem odcinka DNA powielonego metodą PCR-u. Wykonując rozdział na żelu agarozowym możemy więc wykryć obecność lub brak miejsca restrykcyjnego dla Hae III, a tym samym dowiedzieć się, który z nukleotydów (G czy A) znajduje się w pozycji –455.

Allele zawierające A^{-455} ulegają znacznie wyższej ekspresji niż homozygoty zawierające genotyp G/G. Także i w tym przypadku ważną rolę odgrywa czynnik środowiskowy, taki jak palenie papierosów. Osobnicy palący papierosy i posiadający allele A^{-455} charakteryzują się najwyższym poziomem fibrynogenu [15, 17]. U niepalących jest on wyższy średnio o ok. 8,2%, a u byłych palaczy o 9,0%. Efekt ten zależny jest również od wieku. Mężczyźni poniżej 45 roku życia posiadali podwyższony poziom fibrynogenu o 11,6%, a starsi, powyżej 65 roku życia – o 4,5% w stosunku do osobników posiadających allele G/G [17]. Podwyższona ekspresja fibrynogenu w przypadku genotypu A/A jest na tyle duża, że można ją traktować jako czynnik podwyższonego ryzyka zakrzepicy [8].

Badania populacji islandzkich Inuitów odznaczających się niską zapadalnością na chorobę niedokrwienną serca wykazały, że częstotliwość występowania rzadkich alleli łańcucha β fibrynogenu towarzyszących podwyższonemu poziomowi fibrynogenu w tej populacji jest niższa niż np. w populacji kaukaskiej [18]. Generalnie Inuici cechują się stosunkowo niskim poziomem osoczowego fibrynogenu, z wyjątkiem osobników posiadających rzadkie allele A^{-455}. W tym przypadku stężenie białka było porównywalne do tego, jakie obserwuje się w analogicznej sytuacji w populacji kaukaskiej [18].

Mimo iż występowanie korelacji pomiędzy podwyższonym poziomem fibrynogenu a genotypem homo- lub heterozygotycznym zawierającym

allel(e) A jest dość dobrze udokumentowane, kontrowersje budzi nadal związek z zapadalnością na zawał mięśnia sercowego czy chorobę wieńcową. Na podstawie badań przeprowadzonych w ramach programu ECTIM [16, 19], a także przez Gardemanna i wsp. [20], nie można uzyskać jednoznacznej odpowiedzi, czy występowanie tego rodzaju polimorfizmu można uznać za czynnik prognostyczny chorób układu krążenia. Pozornie wydawać by się mogło, że skoro powoduje on podwyższenie poziomu fibrynogenu, który z kolei jest uznanym czynnikiem ryzyka występowania tego rodzaju powikłań, to ta relacja powinna również zachodzić na poziomie molekularnym. Takiej jednoznacznej zależności jednak do tej pory nie stwierdzono. Co więcej, badając grupę pacjentów z przebytym zawałem mięśnia sercowego zaobserwowano, że u osób posiadających allel(e) A^{-455} wystąpił on najpóźniej (średnia wieku w momencie przebycia zawału – 62,9 + 9,8 lat). W przypadku nosicieli alleli G^{-455} średnia wieku wynosiła 56,4 + 10,3 lata [20]. W celu dokładniejszego poznania zależności pomiędzy zmiennością regionu promotorowego łańcucha β fibrynogenu, a występowaniem chorób układu krążenia niezbędne są więc dalsze badania zarówno epidemiologiczne, jak prowadzone w warunkach *in vitro* na poziomie molekularnym.

POLIMORFIZM REGIONU PROMOTOROWEGO PAI-1

Zahamowanie aktywności systemu fibrynolitycznego w osoczu w wyniku podniesienia poziomu głównego inhibitora procesu fibrynolizy PAI-1 jest cechą charakterystyczną dla pierwszego i nawracającego zawału mięśnia sercowego u młodych pacjentów [21, 22], jak również dla niedokrwiennych incydentów związanych z uogólnioną miażdżycą [23]. Mechanizm regulacji ekspresji genu PAI-1 nie jest jeszcze całkowicie poznany. Niemniej jednak wiadomo, że – podobnie jak w przypadku fibrynogenu – zmienność w regionie promotorowym odgrywa w tym procesie ważną rolę.

Wykryty niedawno polimorfizm w pozycji –675 od miejsca startu transkrypcji, polegający na występowaniu lub niedoborze 1 nukleotydu guaninowego (stąd określa się go często jako 4G/5G, rys. 2), wydaje się mieć wpływ na poziom PAI-1 w osoczu [24, 25]. Osobniki homozygotyczne posiadające allele 4G charakteryzują się wyższym stężeniem PAI-1 w osoczu. Obecność alleli 5G nie sprzyja podwyższonej ekspresji genu tego białka [24–26].

Na podstawie dostępnych danych eksperymentalnych trudno jednoznacznie ocenić użyteczność tego parametru jako potencjalnego czynnika ryzyka wystąpienia chorób układu krążenia. Badania przeprowadzone w Szwecji wykazały, że w populacji mężczyzn poniżej 45 roku życia występowaniu allelu 4G towarzyszył 2-krotny wzrost ryzyka zakrzepicy naczyń wieńcowych

Rys. 2. Lokalizcja regionu promotorowego PAI-I 4G/5G. U większości osobników w tym regionie promotora występuje sekwencja 5G/5G (wersja dolna) lub heterozygota 5G/4G. Znacznie rzadziej pojawia się sekwencja 4G/4G (wersja górna). Efektem tej zmienności jest prawdopodobnie zróżnicowane wzajemne oddziaływanie układu DNA/Aktywator/Represor

[25]. Z kolei obserwacje przeprowadzone przez Ridkera i wsp. [27] nie potwierdziły istnienia korelacji pomiędzy występowaniem polimorfizmu 4G/5G a częstością zakrzepicy żylnej lub tętniczej. Z drugiej strony, badania przeprowadzone na dość licznej grupie pacjentów (453 osoby) z udokumentowanymi angiograficznie zmianami zakrzepowymi w naczyniach wieńcowych także wykazały występowanie korelacji pomiędzy poziomem PAI-1 a rodzajem polimorfizmu regionu promotorowego genu kodującego to białko. W przypadku genotypu 4G/4G poziom ten wynosił ok. 22,5 ng/ml, 4G/5G – 21,5 ng/ml, a 5G/5G – 15,8 ng/ml [28]. Genotyp typu 4G/4G znacznie częściej występował u pacjentów z przebytym zawałem mięśnia sercowego [28].

PODSUMOWANIE

Polimorfizm regionów promotorowych powoli staje się równie popularnym pojęciem w genetyce i biologii molekularnej, jak mutacja w obszarze DNA kodującym białko, czyli w genie. Z diagnostycznego i medycznego punktu widzenia istnieje jednak dość zasadnicza różnica pomiędzy tymi zjawiskami. Mutacje wykrywane w obrębie kodującej części genu (egzonów) powodują natychmiastowy efekt fenotypowy. Białko posiada zmienioną strukturę, np. w wyniku wymiany jednego aminokwasu na drugi. Konsekwencją mutacji genowej może być również przesunięcie ramki odczytu lub pojawienie się sekwencji nonsensownej, wskutek czego do syntezy białka w ogóle nie dochodzi.

W przypadku występowania polimorfizmu regionów promotorowych, w dotychczas poznanych przypadkach, struktura, a co za tym idzie i funkcja białka pozostaje nie zmieniona. Ma on natomiast często wpływ na szybkość biosyntezy białka, zwłaszcza pod wpływem modulacji przez czynniki środowiskowe.

Szczególnie dobrze fakt ten można zilustrować na przykładzie fibrynogenu. Fibrynogen, podobnie jak większość czynników procesu krzepnięcia krwi i fibrynolizy, jest białkiem ostrej fazy. Po zadziałaniu bodźca, np. uszkodzenia ciągłości naczynia krwionośnego, znaczna jego ilość zostaje dodatkowo uwolniona do krwi i poziom tego białka gwałtownie się podnosi. Reakcję ostrej fazy można wywołać m. in. intensywnym wysiłkiem, np. ćwiczeniami fizycznymi. Zjawisko to wykorzystał Montgomery i wsp. [29] w celu zbadania roli polimorfizmu G/A^{-455}. Badano poziom fibrynogenu u rekrutów angielskiej armii poddanych intensywnemu 10-tygodniowemu treningowi. W momencie rozpoczęcia treningu stężenie fibrynogenu (uwzględniając wagę ciała, palenie papierosów i wiek) przyjęto za 100%. Efektem intensywnego wysiłku fizycznego po 5 dniach trwania zajęć było obniżenie się poziomu

fibrynogenu w osoczu o ok. 12%. Jednak pomiędzy 1 a 3 dniem zaobserwowano znacznie podwyższony poziom białka w osoczu, co sugerowałoby, iż nastąpiła reakcja ostrej fazy spowodowana tym wysiłkiem. W zależności od genotypu uwzględniającego wspomniany polimorfizm G/A^{-455}: AA, GA, GG, stężenie fibrynogenu wynosiło odpowiednio 189%, 136% lub 127% wartości podstawowej (rys. 3). Tak więc, w zależności od posiadanego genotypu, odpowiedź na bodziec środowiskowy jakim był wysiłek fizyczny u badanych rekrutów armii angielskiej zdecydowanie się różniła.

Rys. 3. Poziom uwalnianego fibrynogenu podczas reakcji ostrej fazy spowodowanej wysiłkiem fizycznym w zależności od rodzaju polimorfizmu G/A^{-455} regionu promotorowego łańcucha β fibrynogenu (objaśnienia w tekście)

Zróżnicowanie wewnątrzpopulacyjne wynikające z polimorfizmu regionów promotorowych tych czynników mechanizmu hemostazy, które mają swój udział w zaburzeniach układu krążenia, daje pewną plastyczność w reakcji na bodźce środowiskowe. Zjawisko to może tłumaczyć m. in. fakt, że nie wszyscy palacze przechodzą zawał mięśnia sercowego.

Badanie genetycznych uwarunkowań chorób układu krążenia jednakże dopiero się rozwija. Jest to rozwój niezwykle dynamiczny i bardzo obiecujący, zarówno jeśli chodzi o postęp w dziedzinie diagnostyki, jak i w terapii [30]. Jedną z głównych praktycznych korzyści, jakie mogą odnieść pacjenci z prowadzonych badań, wydaje się być możliwość wyodrębnienia genetycznych czynników prognostycznych, które pozwoliłyby precyzyjniej oszacować ryzyko pojawienia się choroby układu krążenia, a dzięki właściwej profilaktyce nakierowanej szczególnie na wyodrębnione grupy podwyższonego ryzyka, zapobiegać jej występowaniu.

Podziękowanie

Autorzy składają serdeczne podziękowania p. Krystynie Siewierskiej za pomoc w wyszukaniu, zebraniu i opracowaniu piśmiennictwa oraz mgr. Tomaszowi Wojciechowskiemu za wykonanie rysunków.

LITERATURA

[1] Pearson T. A., Lacava J., Weil H. F. C. (1997), Am. J. Clin. Nutr., **65**, Suppl., S1674–S1682.
[2] Diminno G., Mancini F. P., Margaglione M. (1997), Cardiovasc. Drug. Therapy, **10**, 743–749.
[3] Juhan Vage I. (1996), Atherosclerosis, **124**, Suppl., S49–S55.
[4] Balleisen L., Bailey J., Epping P. H. i wsp. (1985), Thromb. Haemost., **54**, 475–479.
[5] Yarnell J. W. G., Baker I. A., Sweetnam P. M. i wsp. (1991), Circulation, **83**, 836–844.
[6] Wu K. K. (1997), Fibrinolysis Proteolysis, 11, Supp. I; **1**, 31–34.
[7] Roy S. N., Mukhopadhyay G., Redman C. M. J. (1990), Biol. Chem., **265**, 6389–6393.
[8] Humphries S. E., Panahloo A., Montgomery H. E. i wsp. (1997), Thromb. Haemost., **78**, 457–461.
[9] Di Minno G., Mancini M. (1990), Arteriosclerosis, **10**, 1–7.
[10] Meade T. W., Imeson J., Stirling Y. (1987), Lancet, **ii**, 986–988.
[11] Dalmon J., Laurent M., Courtios G. (1993), Mol. Cell. Biol., **13**, 1183–1193.
[12] Huber P., Laurent M., Dalmon J. (1990), J. Biol. Chem., **265**, 5695–5701.
[13] Iso H., Folsom A. R., Winkelmann J. C. i wsp. (1995), Thromb. Haemost., **73**, 106–111.
[14] Connor J. M., Fowkes F. G., Wood J. i wsp. (1992), J. Med. Genet., **29**, 480–482.
[15] Green F., Hamsten A., Blomback M. i wsp. (1993), Thromb. Haemost., **70**, 915–920.
[16] Scarabin P. Y., Bara L., Ricard S. i wsp. (1993), Arterioscler. Thromb., **13**, 886–891.
[17] Thomas A. E., Green F. R., Humphries S. E. (1996), Clin. Genet., **50**, 184–190.
[18] de Maat M. P., de Knijff P., Green F. R. i wsp. (1995), Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., **15**, 856–860.
[19] Behague I., Poirier O., Nicaud V. i wsp. (1996), Circulation, **93**, 440–449.
[20] Gardemann A., Schwartz O., Haberbosch W. i wsp. (1997), Thromb. Haemost., **77**, 1120–1126.
[21] Hamsten A., Wiman B., de Faire U. i wsp. (1997), N. Engl. J. Med., **313**, 1557–1563.
[22] Hamsten A., de Faire U., Waldiu's G. i wsp. (1987), Lancet, **2**, 3–9.
[23] Cortellaro M., Cofrancesco E., Boscheti C. (1993), Arterioscler. Thromb., **13**, 1412–1417.
[24] Dawson S. J., Wiman B., Hamsten A. i wsp., (1993), J. Biol. Chem., **268**, 10739–10745.
[25] Eriksson P., Kallin B., van t'Hooft F. M. i wsp. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**, 1851–1855.
[26] Ye S., Green F. R., Scarabin P. Y. i wsp. (1995), Thromb. Haemost., **74**, 837–841.
[27] Ridker P. M., Hennekens C. H., Lindpaintner K. i wsp. (1997), Circulation, **95**, 59–62.

[28] Osseigerning N., Mansfield M. W., Stickland M. H. i wsp. (1997), Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., **17**, 33–37.
[29] Montgomery H. E., Clarkson P., Nwose O. M. i wsp. (1996), Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., **16**, 386–391.
[30] Chojnowska K. (1997), Kardiologia Pol., **46**, 351–362.

Wpłynęło do Redakcji
Folia biochimica et biophysica
24.04.1998

Pracownia Biotechnologii Medycznej
Zakładu Biochemii
Akademia Medyczna w Łodzi

Klinika Kardiologii
Akademia Medyczna w Łodzi

Tadeusz Pietrucha, Janusz Szemraj, Krzysztof Chiżyński

GENETIC DETERMINANTS OF HAEMOSTASIS IN CARDIOVASCULAR DISEASES THE ROLE OF GENE PROMOTOR REGIONS

In this review the potential role of polymorphism gene promoter regions of beta-chain fibrinogen and plasminogen activator inhibitor type I (PAI-1) in cardiovascular disease is discussed. The thorough discussion covers the potential mechanisms of their effect.