

Received: 2012.03.06  
Accepted: 2012.05.18  
Published: 2012.06.12

## Mutacje genów niekolagenowych we wrodzonej łamliwości kości – znaczenie produktów tych genów w biosyntezie kolagenu i patogenezie choroby

Mutations of noncollagen genes in osteogenesis imperfecta – implications of the gene products in collagen biosynthesis and pathogenesis of disease

**Anna Galicka**

Zakład Chemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

### Streszczenie

Niedawne badania ujawniły, że fenotyp „kruchych kości” we wrodzonej łamliwości kości (osteogenesis imperfecta – OI) jest spowodowany nie tylko przez dominujące mutacje genów kodujących kolagen typu I, ale również recesywne mutacje genów odpowiedzialnych za procesy potranslacyjne prokolagenu typu I i tworzenie kości. Fenotyp większości pacjentów z mutacjami w genach niekolagenowych podobny jest do najcięższych typów OI (III i II) uwarunkowanych mutacjami genów kolagenowych. Mutacje w genach kodujących białka kompleksu P3H1/CRTAP/CyPB, biorącego udział w 3-hydroksylacji kolagenu, eliminują hydroksylację Pro986 w kolagenie typu I i powodują zwiększenie modyfikacji kolagenu z udziałem hydroksylazy 4-prolilowej i lizylowej, jednak znaczenie tych zaburzeń w patomechanizmie choroby nie jest dokładnie znane. Brak funkcji białek kompleksu, pełniących także rolę białek opiekuńczych kolagenu, może stanowić dominujący patomechanizm choroby. Ostatnie odkrycia dodają do różnorodnych czynników powodujących OI i działających na kolagen inne białka opiekuńcze (HSP47 i FKBP65) i białko BMP-1, co podkreśla złożoność procesów dotyczących fałdowania kolagenu i jego sekrecji, jak również ich znaczenie w procesach kościotworzenia. Mutacje w genach kodujących czynnik transkrypcyjny SP7/OSX i czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki (PEDF) stanowią nowy patomechanizm OI, który jest niezależny od zmian w biosyntezie i procesach potranslacyjnych kolagenu.

### Słowa kluczowe:

wrodzona łamliwość kości • mutacje • 3-hydroksylacja kolagenu • białka opiekuńcze kolagenu • BMP-1 • czynnik transkrypcyjny SP7 • czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki

### Summary

Recent investigations revealed that the “brittle bone” phenotype in osteogenesis imperfecta (OI) is caused not only by dominant mutations in collagen type I genes, but also by recessively inherited mutations in genes responsible for the post-translational processing of type I procollagen as well as for bone formation. The phenotype of patients with mutations in noncollagen genes overlaps with very severe type III and lethal type II OI caused by mutations in collagen genes. Mutations in genes that encode proteins involved in collagen prolyl 3-hydroxylation (P3H1/CRTAP/CyPB) eliminated Pro986 hydroxylation and caused an increase in modification of collagen helix by prolyl

4-hydroxylase and lysyl hydroxylase. However, the importance of these disturbances in the disease pathomechanism is not known. Loss of complex proteins' function as collagen chaperones may dominate the disease mechanism. The latest findings added to the spectrum of OI-causing and collagen-influencing factors other chaperones (HSP47 and FKBP65) and protein BMP-1, which emphasizes the complexity of collagen folding and secretion as well as their importance in bone formation. Furthermore, mutations in genes encoding transcription factor SP7/Osterix and pigment epithelium-derived factor (PEDF) constitute a novel mechanism for OI, which is independent of changes in biosynthesis and processing of collagen.

**Key words:** osteogenesis imperfecta • mutations • collagen 3-hydroxylation • collagen chaperones • BMP-1 • transcription factor SP7 • pigment epithelium-derived factor

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1000336>

**Word count:** 5613

**Tables:** 1

**Figures:** 1

**References:** 118

**Adres autorki:** dr hab. n. med. Anna Galicka, Zakład Chemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny, ul. Mickiewicza 2a, 15-222 Białystok; e-mail: angajko@umb.edu.pl

**Wykaz skrótów:** **BiP** – białko wiążące się z ciężkim łańcuchem immunoglobulin (immunoglobulin heavy chain binding protein); **BMP-1** – białko morfogenetyczne kości 1 (bone morphogenetic protein 1); **COL1A1 i COL1A2** – geny kodujące łańcuchy pro $\alpha$ 1(I) i pro $\alpha$ 2(I) prokolagenu typu I; **CRTPA** – białko zasocjowane z chrząstką (cartilage-associated protein); **CyPB** – cyklofilina B (cyclophilin B); **ECM** – macierz pozakomórkowa (extracellular matrix); **ER** – siateczka śródplazmatyczna (endoplasmic reticulum); **FKBP65** – białko wiążące FK506 o masie cząsteczkowej 65 kDa (65-kDa FK506-binding protein); **FKBP10** – gen kodujący białko FKBP65; **GRP** – białko regulowane poziomem glukozy (glucose regulated protein); **HSP47** – białko szoku cieplnego (heat shock protein 47); **LEPRE1** – gen kodujący hydroksylazę 3-prolilową 1 (leucine proline-enriched proteoglycan (leprecan) 1); **LH** – hydroksylaza lizylowa (lysyl hydroxylase); **mTLD** – tolloid ssaczy (mammalian Tolloid); **NMD** – proces niszczenia wadliwego mRNA (nonsense-mediated decay); **OI** – wrodzona łamliwość kości (osteogenesis imperfecta); **PDI** – disulfidoizomeraza białek (protein disulfide isomerase); **PEDF** – czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki (pigment epithelium-derived factor); **P3H** – hydroksylaza 3-prolilowa (prolyl 3-hydroxylase); **P4H** – hydroksylaza 4-prolilowa (prolyl 4-hydroxylase); **PIPB** – gen kodujący cyklofilinę B (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B); **SERPINF1** – gen kodujący PEDF (serpin peptidase inhibitor, clade F, member 1); **SERPINH1** – gen kodujący białko HSP47 (serpin peptidase inhibitor, clade H, member 1); **SP7/OSX** – gen kodujący czynnik transkrypcyjny SP7/Osterix; **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (vascular endothelial growth factor).

#### **WRODZONA ŁAMLIWOŚĆ KOŚCI UWARUNKOWANA DOMINUJĄCYMI MUTACJAMI GENÓW KOLAGENU TYPU I**

Wrodzona łamliwość kości (osteogenesis imperfecta – OI) jest chorobą tkanki łącznej, zróżnicowaną pod względem genotypowym i fenotypowym [25,31,40,41,105]. Podstawową cechą kliniczną choroby jest kruchość i łamliwość kości wskutek niewielkich urazów, a nawet codziennych aktywności ruchowych; liczba złamań może się wahać od kilku do kilkudziesięciu w ciągu roku. Chorzy są zazwyczaj niskiego wzrostu i mają zaburzone proporcje ciała, spowodowane licznymi deformacjami kończyn i tułowia. Do innych objawów klinicznych należą: niebieskie lub szare zabarwienie twardówek, upośledzenie słuchu, skłonność do krwawień oraz objawy stomatologiczne w postaci niepełnego tworzenia zębiny, określane mianem dentinogenesis

imperfecta. Rozwój umysłowy chorych jest prawidłowy, inteligencja często przewyższa normę. Częstość występowania choroby szacuje się na 1 do 10 tys. urodzeń.

W końcu lat siedemdziesiątych ub.w. Sillence i wsp. [92,93] stosując kryteria radiologiczne, kliniczne i genetyczne, podzielili OI na 4 typy (I–IV). OI typu I jest najłagodniejszą postacią choroby, cechującą się mało nasiloną łamliwością kości, minimalnymi deformacjami szkieletu lub ich brakiem, niebieskimi twardówkami, osteopenią, niższym lub prawidłowym wzrostem i rozluźnieniem więzadeł. Może dojść do wczesnej utraty słuchu. Jeżeli występują złamania, ustają one zwykle wraz z osiągnięciem wieku dojrzenia. Dodatkowo typ I dzieli się na 2 podtypy: IA, jeżeli brak jest zmian w zębach i IB, jeżeli są obecne. Najbardziej nasiloną, śmiertelną postacią choroby jest typ II. Dziecko

rodzi się z licznymi złamaniami i deformacjami kości długich, do których dochodzi wewnątrz macicy, krótkimi żebrami, dużą niezmineralizowaną czaszką, wąską klatką piersiową i umiera z powodu niewydolności oddechowej. Do najcięższych przeżywalnych postaci choroby należy postępująco-deformujący typ III. Występuje nasilona łamliwość kości, narastające wraz z wiekiem deformacje kości i sylwetki, skolioza i bardzo niski wzrost powodujące niemożność chodzenia. Objawem radiologicznym w obrazie kręgosłupa są tzw. rybie kręgi, skośne ustawienie żeber oraz zniekształcenie miednicy. Typ IV jest umiarkowanie deformujący; występuje bardziej nasilona niż w typie I łamliwość kości, średni niedobór wzrostu, deformacja kończyn długich oraz często zwyrodnienie zębiny. Nasilenie objawów w chorobie można przedstawić w sposób następujący: typ I < typ IV < typ III < typ II.

Ponad 90% przypadków choroby typów I–IV jest uwarunkowanych mutacjami genów *COL1A1* (17q21.31-22.05) i *COL1A2* (7q21.3-22.1) kodujących odpowiednio łańcuchy  $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$  i  $\text{pro}\alpha 2(\text{I})$  prokolagenu typu I, stanowiącego główne białko strukturalne skóry, kości, więzadeł, ścięgien, twardówki i zębów [18,28,32,63,81]. Mutacje te są dziedziczone jako cecha dominująca oraz powstają *de novo* u dziecka zdrowych rodziców. Wystąpienie tej samej mutacji u kolejnego dziecka bezobjawowych rodziców związane jest ze zjawiskiem mozaikowości komórek rozrodczych; ryzyko dziedziczenia mutacji szacuje się na 5–7%.

Obniżenie o prawie 50% biosyntezy kolagenu spowodowane jest mutacjami hamującymi ekspresję jednego allelu najczęściej genu *COL1A1* i jest przyczyną najłagodniejszej postaci choroby typu I [9,34,114]. Znacznie gorsze konsekwencje wiąże się z mutacjami strukturalnymi i ekspresją kolagenu o nieprawidłowej strukturze i funkcji, co się zdarza w OI typu II, III i IV [10,18,28,32,35,36,37,63]. Mutacje te określane są jako dominująco-negatywne, ponieważ wpływają destrukcyjnie na strukturę cząsteczek kolagenu zawierających oprócz zmutowanych również łańcuchy o prawidłowej strukturze, przyczyniając się do ich zwiększonej degradacji [87]. Do najczęściej występujących mutacji w genach kolagenowych należą substytucje reszt glicyny przez inne aminokwasy, które zaburzają tworzenie potrójnej helisy [10,11]. Do innych częściej spotykanych mutacji należą delecje i insercje w części kodującej, mutacje w C-propeptydzie oraz mutacje w intronach zaburzające składanie RNA. Mimo wykrycia ponad 1500 mutacji w genach kolagenowych, poza mutacjami zerowymi (null) powodującymi redukcję ilości kolagenu typu I w łagodniejszym typie I, brak jest korelacji między genotypem a fenotypem w pozostałych typach choroby. Marini i wsp. [73] donoszą o istnieniu domen z mutacjami letalnymi i nieletalnymi w różnych regionach łańcuchów  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  kolagenu typu I, co wskazuje na istotne znaczenie interakcji kolagenu z białkami niekolagenowymi w tworzeniu kości.

#### **WRODZONA ŁAMLIWOŚĆ KOŚCI UWARUNKOWANA RECESYWNymi MUTACJAMI GENÓW NIEKOLAGENOWYCH**

Chociaż klasyfikacja Sillence'a jest do dziś stosowana w praktyce klinicznej, u prawie 10% chorych ze zdiagnozowaną wrodzoną łamliwością kości, występują specyficzne objawy kliniczne i brak mutacji w genach kolagenowych. Od 2000 roku, w oparciu o nowe odkrycia

patomechanizmów, klasyfikacja OI została rozszerzona o kolejnych 7 typów choroby [31,103] (tabela 1). Typ V, o nieznanym podłożu genetycznym, charakteryzuje się nadmiernym kostnieniem w miejscach złamań, wapnieniem błon międzykostnych przedramienia oraz obecnością w obrazie radiologicznym pasmowatych wysyczeń przynasad, bezpośrednio przylegających do płytek wzrostowych [42]. W VI typie choroby stwierdza się obecność blaszek kostnych przypominających rybią łuskę, nadmierną liczbę osteoidów oraz wczesne występowanie złamań kompresyjnych kręgów [43], natomiast w typie VII skrócenie bliższych końców kości ramieniowej i udowej [109]. W 2006 r. Barnes i wsp. [8] wykryli mutacje w genie *CRTAP* kodującym białko CRTAP (cartilage associated protein), biorące udział w 3 hydroksylacji kolagenu, u osób ze zdiagnozowaną klinicznie wrodzoną łamliwością kości. Kolejne wykryte mutacje dotyczyły genów *LEPRE1* i *PP1B*, kodujących kolejno 3 hydroksylazę prolilową 1 i cyklofilinę B, występujące w kompleksie z białkiem CRTAP [19,102,113]; genów *SERPINH1* i *FKBP10* kodujących białka opiekuńcze, o istotnym znaczeniu w tworzeniu potrójnej helisy kolagenu i jego wydzielaniu [2,27]; genu *BMP1*, kodującego białko o aktywności C-proteinyazy prokolagenu typu I [74]; genu *SP7/OSX* kodującego czynnik transkrypcyjny SP7 [66] oraz genu *SERPINF1*, kodującego białko PEDF (pigment epithelium-derived factor) [12,46]. Badania histologiczne wykazały, iż mutacje w genie *SERPINF1* są odpowiedzialne za fenotyp OI typu VI.

Rozszerzoną klasyfikację Sillence'a i wsp. [92] z uwzględnieniem proponowanej przez innych autorów [31,103] przedstawia tabela 1.

#### **MODYFIKACJE POTRANSLACYJNE PROKOLAGENU**

Przed utworzeniem potrójnej helisy prokolagenu w C-końcowym propeptydzie tworzą się wewnątrz- i międzyłańcuchowe mostki disiarczkowe z udziałem disulfidoizomerazy białek [EC 5.3.4.1] [61], a wiązania imidowe reszt proliny ulegają izomeryzacji do postaci trans z udziałem peptydylo-prolilowej cis-trans izomerazy [EC 5.2.1.8] [33]. Łańcuchy prokolagenowe ulegają podstawowym modyfikacjom: hydroksylacji reszt prolilowych i lizylowych oraz glikozylacji reszt hydroksylizylowych. Reakcje te zachodzą w ER podczas syntezy łańcuchów polipeptydowych i są kontynuowane jako modyfikacje potranlacyjne aż do utworzenia potrójnej helisy. Niektóre reszty proliny ulegają hydroksylacji do 4-hydroksyproliny i 3-hydroksyproliny z udziałem hydroksylazy 4-prolilowej (P4H) [EC 1.14.11.2] [57,58] i hydroksylazy 3-prolilowej 1 (P3H1) [EC 1.14.11.7] [108]. P4H katalizuje hydroksylację reszt prolilowych występujących w sekwencji Xaa-Pro-Gly w kolagenach i ponad 15 białkach zawierających domeny kolagenowe [57]. Enzym ten jest tetramerem zbudowanym z 2 podjednostek  $\alpha$  i 2 podjednostek  $\beta$  [ $\alpha_2\beta_2$ ] o masie cząsteczkowej ~240 kDa. Poznano 2 izoformy enzymu (P4HA1 i P4HA2), różniące się podjednostką katalityczną  $\alpha$ , natomiast identyczna w obu izoformach podjednostka  $\beta$  spełnia rolę białka opiekuńczego – disulfidoizomerazy białek (PDI) [EC 5.3.4.1] [57,58]. W komórkach ludzkich wykryto jeszcze jedną izoformę enzymu P4H o znacznie mniejszej ekspresji niż P4HA1 i P4HA2 [64]. Reszty lizyny (około 1/4) ulegają hydroksylacji z udziałem hydroksylazy lizylowej (LH) [EC 1.14.11.4] [58,116]. Niektóre reszty

Tabela 1. Podział i krótka charakterystyka OI

Typ OI	Gen	Locus genu	Białko	Opis kliniczny	Sposób dziedziczenia
<b>Mutacje w genach kolagenowych</b>					
I	<i>COL1A1</i> <i>COL1A2</i>	17q21.31-22.05 7q21.3-22.1	kolagen I kolagen I	łagodny	AD
II	<i>COL1A1</i> <i>COL1A2</i>	17q21.31-22.05 7q21.3-22.1	kolagen I kolagen I	letalny	AD
III	<i>COL1A1</i> <i>COL1A2</i>	17q21.31-22.05 7q21.3-22.1	kolagen I kolagen I	postępująco-deformujący	AD
IV	<i>COL1A1</i> <i>COL1A2</i>	17q21.31-22.05 7q21.3-22.1	kolagen I kolagen I	umiarkowanie deformujący	AD
<b>OI o nieznanym podłożu molekularnym</b>					
V	–	–	–	podobny objawowo do typu IV, różnice histologiczne	AD
<b>Mutacje czynnika pochodzącego z nabłonka barwnikowego siatkówki</b>					
VI	<i>SERPINF1</i>	17p13.3	PEDF	podobny objawowo do typu III, różnice histologiczne, zaburzenia mineralizacji	AR
<b>Mutacje składników kompleksu biorącego udział w 3-hydroksylacji kolagenu</b>					
VII	<i>CRTAP</i>	3p22.3	CRTAP	podobny objawowo do typów II/III	AR
VIII	<i>LEPRE1</i>	1p34.2	Leprekan P3H1	podobny objawowo do typów II/III	AR
IX	<i>PIIB</i>	15q22.31	Cyklofilina B	podobny objawowo do typów II/III i III/IV	AR
<b>Mutacje białek opiekuńczych, biorących udział w fałdowaniu i sekrecji kolagenu</b>					
X	<i>SERPINH1</i>	11q13.5	HSP47	podobny objawowo do typów III/II	AR
XI	<i>FKBP10</i>	17q21.2	FKBP65	podobny objawowo do typu III/IV	AR
<b>Mutacja czynnika transkrypcyjnego SP7</b>					
?	<i>SP7/OSX</i>	12q13.13	Sp7/Osterix	podobny objawowo do typu IV	AR
<b>Mutacja białka morfogenetycznego kości 1</b>					
?	<i>BMP1</i>	8p21.3	BMP1	podobny objawowo do typu III	AR

AD – dziedziczenie OI jako cechy autosomalnej dominującej (autosomal dominant); AR – dziedziczenie OI jako cechy autosomalnej recesywnej (autosomal recessive).

hydroksylizyny są miejscem wiązania galaktozy lub galaktozyloglukozy [58]. Wymienione enzymy należą do dioksygenaz 2-oksoglutaranu i wymagają do swojej aktywności tlenu cząsteczkowego,  $\alpha$ -ketoglutaranu, jonów żelaza (II) i kwasu askorbinowego. Chociaż geny kodujące enzymy P4H i LH są różne, w ich aktywnych domenach katalitycznych występują reszty aminokwasów konserwatywnych ewolucyjnie [56].

Po wydzieleniu prokolagenu z komórki zachodzi konwersja prekursorowej postaci kolagenu w tropokolagen przez odłączenie N- i C-końcowych fragmentów globularnych z udziałem N-proteinyzy prokolagenu [EC 3.4.24.14] i C-proteinyzy prokolagenu [EC 3.4.24.19] [20,88]. Funkcją propeptydów jest zapobieganie wewnątrzkomórkowej fibrylogenezie.

Cząsteczki tropokolagenu asocjują spontanicznie tworząc włókna kolagenowe o regularnej strukturze; badania ostatnich lat dowodzą że w procesie fibrylogenezy biorą udział inne składniki ECM: fibronektyna, integryny i kolagen typu V [20,51,52,56]. Włókna kolagenowe są stabilizowane przez międzycząsteczkowe i międzyfibrylarne kowalencyjne wiązania poprzeczne, inicjowane przez oksydacyjną dezaminację niektórych reszt lizyloowych i hydroksylizyloowych z udziałem oksydazy lizylowej [EC 1.4.3.14] [15,16,20,116].

#### **ZNACZENIE KOMPLEKSU P3H1/CRTAP/CyPB W ETIOLOGII OI**

Od dawna wiadomo, że 4-hydroksyprolina determinuje stabilność kolagenu [13], natomiast rola 3-hydroksyproliny,

wykrytej ponad 50 lat temu, nie jest znana. Zainteresowanie znaczeniem 3-hydroksylacji proliny zaczęło się w ostatnich latach od wykrycia mutacji w genie *CRTAP*, powodującej recesywną postać OI [8,78]. Gen ten koduje białko *CRTAP* (cartilage-associated protein), występujące w ER w kompleksie z hydroksylazą 3-proliłową 1 (P3H1) i cyklofiliną B (CyPB), uczestniczącym w 3-hydroksylacji niektórych reszt proliny różnych typów kolagenu. Badania ostatnich lat dowiodły, że w modyfikacji kolagenów fibrylarnych uczestniczą składniki kompleksu P3H1/*CRTAP*/CyPB w stosunku 1:1:1 [78,108]. W kolagenie typu I wykryto jedno główne miejsce 3-hydroksylacji reszty proliny w łańcuchu  $\alpha 1$  (Pro986) w sekwencji -Pro-4Hyp-Gly, występującej w domenie GLPGPIGGPGR, która jest konserwatywna wśród kręgowców i zbliżona do domeny występującej w kolagenie typu II (GIPGPIGGPGR). Każdy ze składników kompleksu stanowi białko wielofunkcyjne pełniące niezależne funkcje nie tylko w komórce, ale również w macierzy pozakomórkowej (ECM – extracellular matrix) [22,48,110], a ich znaczenie w patomechanizmie recesywnej postaci OI zostało potwierdzone na modelach mysich.

### Mutacje białka *CRTAP* (cartilage-associated protein)

Rola białka *CRTAP* nie jest do końca wyjaśniona, wykazano, że ulega ono ekspresji w wielu tkankach mysich, kurzych i ludzkich. Transkrypt genu *CRTAP* po raz pierwszy zidentyfikowano w hodowlach chondrocytów hipertroficznym pochodzących od kurcząt [22]. Ekspresję *CRTAP* wykazano nie tylko w ER, ale również w macierzy pozakomórkowej chondrocytów, co sugerowało jego funkcję komórkową i pozakomórkową. Białko to wykryto ponadto w skórze, sercu, płucach oraz w nasadach kości piszczelowych, udowych i chrząstce stawowej zarodków kurcząt. Znaczną ekspresję białka *CRTAP* wykazano także we wszystkich stadiach różnicowania się chrząstki myszy, zwłaszcza w proliferujących chondrocytach płytki wzrostowej, a także w osteoblastach i osteoklastach, co wskazuje na jego znaczenie w rozwoju układu kostnego [72,79,80]. Podobnie jak u kurcząt, *CRTAP* wykryto w wielu innych embrionalnych tkankach mysich: mózgu, sercu, płucach, nerkach, jądrze, skórze, a w układzie kostnym w obojczyku i połączeniu chrząstkowo-kostnym [78].

Znaczenie tego białka w rozwoju układu kostnego potwierdza fenotyp myszy *Crtap*<sup>-/-</sup> (z wyłączonym genem *CRTAP*), u której wystąpiła recesywna postać osteochondrodysplazji, zahamowanie wzrostu, osteopenia, rizo-melia (skrótowania kości udowych) i postępujące tylne wygięcie kręgosłupa [78]. Wykazano brak 3-hydroksylacji kolagenu typu I w kości i skórze oraz kolagenu typu II w chrząstce myszy, zaburzenie modyfikacji potranslacyjnych kolagenu, wzmożone wydzielanie kolagenu przez osteoblasty i zwiększoną średnicę fibryli kolagenowych.

U ludzi gen *CRTAP* umiejscowiony na chromosomie 3p22.3 koduje białko o masie cząsteczkowej 46,5 kDa i ulega ekspresji również nie tylko w tkance kostnej, ale i w sercu, płucach, czy jelicie cienkim [99]. Sekwencja ludzkiego i kurzego białka *CRTAP* jest tylko w 51% identyczna, ponieważ w kurzym *CRTAP* brakuje 130 reszt aminokwasów C-końcowych, natomiast sekwencje mysiego i ludzkiego białka są identyczne w 89%. Większość mutacji, wykrytych u osób z OI w genie *CRTAP*, stanowią delecje i duplikacje

skutkujące przedwczesną terminacją transkrypcji oraz degradacją transkryptów w procesie NMD [71]. Brak lub zmniejszenie ilości białka *CRTAP* i 3-hydroksylacji kolagenu typu I jest przyczyną OI typu VII o objawach porównywalnych do letalnego typu II i progresywno-deformującego typu III z mutacjami w genach kolagenu typu I. W przypadku niewielkiej delecji w genie *CRTAP*, niepowodującej degradacji transkryptów, ilość białek *CRTAP* i P3H1 oraz poziom 3-hydroksylacji były także znacznie zredukowane [3]. Stopień ekspresji *CRTAP* i 3-hydroksylacji kolagenu nie koreluje z fenotypem, co wskazuje na bardziej złożony patomechanizm choroby. Przykładem może być nieznacznie obniżona 3-hydroksylacja kolagenu typu I (o 10%), wskutek mutacji Leu67Pro w genie *CRTAP*, wykazana u osoby z bardzo ciężkim przebiegiem choroby, objawiającej się złamaniami i bardzo ograniczonym wzrostem [6].

### Mutacje hydroksylazy 3-proliłowej 1 (P3H1)

W ludzkim genomie wykryto trzy różne geny kodujące trzy izoformy hydroksylazy 3-proliłowej: P3H1, P3H2 i P3H3, charakteryzujące się swoistą tkankowo ekspresją [97,108]. Z trzech izoform tylko hydroksylaza 3-proliłowa 1 (P3H1), kodowana przez gen *LEPRE1*, zawiera „KDEL” (sygnałową sekwencję retencji w ER) i jest odpowiedzialna za modyfikację kolagenu typu I [113]. Wzmocniona ekspresja P3H2 w nerkach płodu i dojrzałej myszy potwierdza hipotezę, że ta aktywność enzymatyczna jest niezbędna w rozwoju i funkcji błon podstawnych [97]. Ekspresja genu *P3H3* jest mniej swoista i zachodzi wspólnie z genami *P3H1* i *P3H2* [21].

Hydroksylacja kolagenu nie jest jedyną funkcją P3H1, o czym świadczą trzy alternatywne postaci białka, wyizolowane niezależnie w różnych ośrodkach badawczych. Wassenhove-McCarthy i McCarthy [110] jako pierwsi wyizolowali P3H1 z linii komórek nowotworowych L-2, pochodzących z guza pęcherzyka żółtkowego szczura, jako siarczan chondroityny – leprekan (leucine-proline enriched proteoglycan). Mimo obecności sekwencji „KDEL”, leprekan ulegał sekrecji pozakomórkowej. Stosując przeciwciała poliklonalne wykazano jego obecność w błonie podstawnej naczyń, mięśniach gładkich kłębuszków i kanalików nerkowych, w wątrobie, mięśniach szkieletowych oraz skórze i chrząstce szczura. Vranka i wsp. [108] wyizolowali P3H1, o masie cząsteczkowej 160 kDa, z zarodków kurzych (występował w skórze, ścięgnach i chrząstce), a sekwencja genu P3H1 była homologiczna z leprekanem i supresorem wzrostu Gros1. Gros1 to ludzki homolog leprekanu, wyizolowany z komórek NIH3T3 jako potencjalny supresor wzrostu, którego gen zlokalizowano na chromosomie 1p31, w regionie ulegającym zmianom u dzieci z nowotworami germinalnymi [54]. Wykryto 2 postaci transkryptu, powstałe w wyniku alternatywnego składowania RNA, kodujące białka o masach cząsteczkowych 41 i 84 kDa i oznaczone jako Gros1-S i Gros1-L. Gros1-L ulega ekspresji głównie w sercu, płucach i nerkach dorosłego człowieka, natomiast Gros1-S dominuje w mózgu i grasicy płodu. W wątrobie, mięśniach szkieletowych, śledzionie i trzustce występują obie formy transkryptów w tych samych ilościach.

Ponieważ P3H1 wykazuje aktywność *in vitro* bez udziału składników kompleksu uważa się, że stanowi on

enzymatyczny składnik kompleksu, natomiast CRTAP służy jako białko „pomocnicze” [78,108]. Porównanie sekwencji obu białek wskazało, że CRTAP wykazuje duży stopień homologii (55%) z N-końcową domeną P3H1, jednakże nie ma domeny katalitycznej [72]. Inaktywacja genu *LEPRE1* u myszy powoduje zmiany w ultrastrukturze fibryli kolagenowych w różnych tkankach: kościach, ścięgnach i skórze, obniżenie gęstości kości, skrzywienie i skrócenie kości oraz opóźnioną ich osyfikację [107]. Ilość kolagenu wyizolowanego z kości i innych tkanek była mniejsza i brak w nim było 3-hydroksyprowliny, co sugeruje ważną rolę P3H1 w biosyntezie kolagenu i integralności tkanek, głównie tych zawierających kolagen włóknienkowy. Istnieją jednak doniesienia o częściowej hydroksylacji kolagenu mimo braku białka P3H1, co może wskazywać na udział innych hydroksylaz P3H2 i P3H3 w tym procesie [6,19,49]. Wykazano, że zrekombinowany enzym P3H2, chociaż preferencyjnie hydroksylował w syntetycznych peptydach reszty proliny w sekwencji charakterystycznej dla kolagenu typu IV, był również aktywny w stosunku do sekwencji kolagenu typu I [97]. Vranka i wsp. [106] oraz Capellini i wsp. [21] donosili, że P3H2 ulega współekspresji z P3H1 i P3H3 w rozwijających się zarodkach mysich w różnych tkankach, w których ulegają ekspresji kolageny fibrylarne: chrząstce, kości i skórze, co sugeruje ich znaczenie również w procesach, jakim ulegają kolageny fibrylarne.

Mutacje w genie *LEPRE1*, podobnie jak mutacje w genie *CRTAP*, powodują przedwczesną terminację transkrypcji, co wiąże się z redukcją transkryptów genu i obniżeniem lub brakiem 3-hydroksylacji kolagenu [71,72,113]. W przypadku niektórych mutacji występujących w ostatnim eksonie, nawet mimo braku degradacji transkryptów genu, poziom hydroksylacji był również obniżony. Kolagen syntetyzowany przez fibroblasty osób z mutacjami w genach *CRTAP* i *LEPRE1* charakteryzował się, podobnie jak w przypadku mutacji w genach kolagenowych, zwiększeniem 4-hydroksylacji reszt prolinowych i 5-hydroksylacji reszt lizyloowych oraz glikozylacji reszt hydroksylizyloowych [8,19]. Zwiększenie tych modyfikacji „overmodification” przy braku białek CRTAP i P3H1 obejmuje jednakże całą domenę potrójnej helisy w przeciwieństwie do fenotypowo podobnych typów II i III OI, w których strukturalny defekt występuje od N-końca do miejsca mutacji w genach kolagenowych. Mutacje w genach kolagenowych powodują zaburzenia tworzenia potrójnej helisy i zwiększonego wskutek tego czasu ekspozycji łańcuchów prokolagenowych na działanie 4-hydroksylazy prolinowej i hydroksylazy lizylowej [10,18,32,65,105]. Brak składnika kompleksu i 3-hydroksylacji kolagenu zaburza tworzenie potrójnej helisy kolagenu przez niepoznany jeszcze mechanizm. Nieoczekiwaną konsekwencją mutacji w genie *CRTAP* i braku 3-hydroksylacji było zwiększenie temperatury topnienia kolagenu typu I [71]. Początkowe badania z syntetycznymi peptydami sugerowały, że 3-Hyp destabilizuje potrójną helisę i że peptydy z sekwencją Ac-(Gly-3(S)Hyp-4(R)Hyp)10-NH<sub>2</sub> nie tworzą potrójnej helisy [50]. Późniejsze badania wykazały jednak, że 3Hyp w pozycji Xaa w sekwencji Gly- Xaa-Yaa zwiększa stabilność kolagenu [77]. Według Torre-Blanco i wsp. [100] zwiększenie modyfikacji potranslacyjnych towarzyszące zaburzeniom 3-hydroksylacji, przy braku mutacji w genach kolagenowych powodujących zmianę struktury pierwszorzędowej

kolagenu i obniżenie termostabilności kolagenu, może działać stabilizująco na kolagen.

W przypadku mutacji w genie *LEPRE1* i braku P3H1 zakaskujące było zwiększenie wydzielania kolagenu przez fibroblasty o 20–50% [19]. Kolagen z zaburzonymi modyfikacjami potranslacyjnymi, wskutek mutacji w genach kolagenowych, zwykle ulega retencji wewnątrzkomórkowej, co prowadzi do aktywacji UPR (unfolded protein response) [69,115] i zwiększenia syntezy białek opiekuńczych: HSP47, PDI, BiP i P4H [24,59]. Ponieważ odpowiedź komórki na nieprawidłowo sfałdowane białka wiąże się z hamowaniem ich translacji, zwiększenie syntezy kolagenu w fibroblastach, w których nie wykryto P3H1 może sugerować bezpośrednią lub pośrednią rolę P3H1 w regulacji syntezy i wydzielania kolagenu [71].

Kliniczne objawy typu VIII choroby uwarunkowanej mutacjami w genie *LEPRE1*, są podobne do ciężko deformującego i letalnego typu II/III wg klasyfikacji Sillenc'a i wsp. [92,93], jednakże w przeciwieństwie do niebieskich twarówek, trójkątnej twarzy i wąskiej klatki piersiowej występują szare twarówki, okrągła twarz i szersza klatka piersiowa [19]. Podobnie jak w OI typu II i III występuje dużo złamań, natomiast w VIII typie choroby cechą niespotykaną w pozostałych typach choroby są długie ręce z długimi paliczkami i krótkim śródrezczem oraz wiotkością stawów. U najdłużej żyjącego pacjenta (17 lat) z VIII typem choroby, oprócz defektów kostnych, występowały objawy osteochondrodysplazji oraz bardzo zaawansowanej osteoporozy (gęstość kości wynosiła –11 w skali T-score) [113].

Fenotypy osób z mutacjami zerowymi (null) genów *CRTAP* i *LEPRE1*, jak również opisane zaburzenia modyfikacji potranslacyjnych kolagenu są bardzo podobne w obu typach choroby (VII i VIII). Podobieństwa te mogą wynikać z wzajemnej protekcji białek CRTAP i P3H1, ponieważ mutacja w jednym z genów kodujących te białka, powoduje brak obu białek kompleksu enzymatycznego [23]. P3H1/CRTAP jest pierwszym przykładem kompleksu eukariotycznego występującego w ER z wzajemną stabilizacją składników; inne tego typu kompleksy występują w jądrze, cytoplazmie i szlakach wydzielniczych. Ilość trzeciego składnika kompleksu – cyklofiliny B (CyPB) nie zależy od mutacji „null” występujących w *CRTAP* czy *LEPRE1*. W komórkach z wyłączonym genem *LEPRE1* i brakiem P3H1, obserwowano wzmożone wydzielanie białka CRTAP. Tak więc oba składniki kompleksu są białkami multifunkcyjnymi, oba są wydzielane do macierzy pozakomórkowej, pełniąc w niej określone funkcje [23,71,72].

### Mutacje cyklofiliny B (CyPB)

Podobnie jak w przypadku białek P3H1 i CRTAP, znaczenie trzeciego składnika kompleksu P3H1/CRTAP/CyPB nie jest dokładnie znane. CyPB stanowi białko o masie cząsteczkowej 21 kDa i należy do cyklofilin – klasy konserwatywnych białek wewnątrzkomórkowych i/lub wydzielniczych, początkowo identyfikowanych jako komórkowe białka wiążące immunosupresyjny lek – cyklosporynę A [117]. Cyklofiliny należą do rodziny peptydylo-prolinowych cis-trans izomeraz, katalizujących izomeryzację wiązań peptydowych, a ich różne izoformy mają podobną sekwencję w centralnych domenach wiążących cyklosporynę.

Cyklofilina B zawiera sekwencję sygnałową kierującą ją do ER, a także ulega wydzielaniu pozakomórkowemu [94] i odgrywa ważną rolę w zapaleniu, infekcjach wirusowych i procesach nowotworowych [117]. Nie wykazuje żadnych podobieństw strukturalnych do CRTAP i P3H1. Bachinger [4] stosując częściowo oczyszczony enzym wykazał *in vitro* 3-krotny wzrost szybkości zwijania się prokolagenu typu III, sugerując, że izomeryzacja wiązań X-Pro z postaci *cis* do *trans* jest czynnikiem ograniczającym fałdowanie łańcuchów. Rolę CyPB w fałdowaniu łańcuchów potwierdzili *in vivo* Steinmann i wsp. [95].

U myszy z wyłączonym genem *PPIB* (*Ppib*<sup>-/-</sup>), kodującym CyPB, wystąpiła zredukowana masa ciała, kifoza i obniżona gęstość kości [26]. Nieprawidłowa struktura fibryli kolagenowych w tkance podskórnej i zwiótnienie skóry sugerują, że CyPB spełnia istotną funkcję w biosyntezie kolagenu nie tylko w tkance kostnej. Wcześniej donoszono, że mutacje w genie *PPIB* powodują autosomalną recesywną chorobę u koni, znaną jako HERDA, charakteryzującą się nadmierną rozciągliwością skóry i bliznowacieniem, jednakże patomechanizm molekularny choroby był nieznan [101].

Mutacje w genie *PPIB* i brak lub zmniejszenie ilości cyklofiliny B u ludzi są przyczyną wrodzonej łamliwości kości typu IX z objawami podobnymi do opisanych wyżej typów (VII i VIII) choroby, spowodowanych mutacjami w genach kodujących pozostałe składniki kompleksu (CRTAP i P3H1). U niektórych osób z OI typu IX występuje jednak łagodniejszy przebieg choroby (nie występuje rizmelia i drastyczne hamowanie wzrostu); gęstość kości wykazuje wyższe wartości [(-1,3) – (-3,9) w skali Z-score] w porównaniu do OI typów VII i VIII [(-6) – (-7)] [6,8,78,102,113]. U bliźniąt z mutacją w kodonie start genu *PPIB* nie wykazano ekspresji cyklofiliny B, a fenotyp był umiarkowanie łagodny [7]. W przeciwieństwie do mutacji w genach *LEPRE1* i *CRTAP* powodujących brak lub o prawie 90% obniżoną 3-hydroksylację Pro986 w kolagenie typu I, przy braku CyPB wykazano znacznie niższą redukcję ilości 3-Hyp, natomiast podobnie jak w nieobecności P3H1 i CRTAP kolagen ulegał zwiększonej 4-hydroksylacji reszt prolilowych i 5-hydroksylacji reszt lizyloowych [102]. Ostatnie badania wykazały, że składniki kompleksu P3H1/CRTAP/CyPB pełnią także funkcję białek opiekuńczych kolagenu, a zaburzenie tych funkcji może mieć bardziej istotne znaczenie w etiologii OI niż brak 3-hydroksylacji proliny [48]. Prawdopodobnie białka tego kompleksu wiążą się z niesfałdowanymi łańcuchami prokolagenowymi w celu utworzenia trihelikalnej struktury prokolagenu i hamują tworzenie fibryli *in vitro*, sugerując, że mogą one zapobiegać przedwczesnej agregacji cząsteczek kolagenu w czasie ich wydzielania z komórek. Cyklofilina B bierze udział w wydzielaniu prokolagenu razem z HSP47 [94]. Jak wcześniej wspomniano mutacje zerowe (null) w jednym z genów *CRTAP/LEPRE1* powodują brak obu białek (P3H1 i CRTAP) bez wpływu na CyPB, co sugeruje większy stopień niezależności tego białka od pozostałych składników kompleksu P3H1/CRTAP/CyPB [78,102]. Choi i wsp. [26] uważają jednak, że brak któregośkolwiek ze składników tego kompleksu powoduje w znacznym stopniu utratę zdolności wiązania cyklofiliny B z kolagenem. Nieznane są również warunki działania jej jako peptydylo-prolilowej *cis-trans* izomerazy; możliwe, że

stabilny dimer CRTAP/P3H1 asocjuje z CyPB i przenosi ją do substratu w miejsce wyznaczone przez 3-Hyp [79].

Alternatywny mechanizm działania cyklofiliny B może dotyczyć jej udziału w retrotranslokacji nieprawidłowo sfałdowanego kolagenu do cytosolu w celu jego degradacji z udziałem proteasomu [30,90]. U myszy z brakiem CyPB kolagen umiejscowiony w ER może sugerować opóźnienie jego modyfikacji i wydzielania lub usuwania do cytosolu w celu degradacji. CyPB jest również składnikiem innego kompleksu występującego w ER, w skład którego wchodzi PDI, BiP i kalretikulina [62]. Kompleks ten, podobnie jak P3H1/CRTAP/CyPB, ułatwia fałdowanie i zapobiega agregacji łańcuchów prokolagenowych, a znaczenie CyPB jest szczególnie istotne we wczesnych etapach fałdowania łańcuchów i inicjacji tworzenia potrójnej helisy kolagenu [89].

Barnes i wsp. [7] donosili z kolei, że w fibroblastach osób z umiarkowanie ciężkimi objawami OI i brakiem CyPB, modyfikacje potranslacyjne kolagenu typu I i szybkość tworzenia potrójnej helisy były prawidłowe, co może sugerować, że CyPB nie jest swoistą izomerazą kolagenu typu I. Przypuszcza się, że inne białko – FKBP65, wiążące się z kolagenem, może pełnić rolę głównej peptydylo-prolilowej *cis-trans* izomerazy lub że oba białka FKBP65 i CyPB mają podobne funkcje. Ponieważ u osób z OI, u których nie wykryto zmian w tworzeniu trihelikalnej struktury kolagenu, nie ulegał zmianie kompleks P3H1-CRTAP i 3-hydroksylacja kolagenu, przypuszcza się, że ta modyfikacja powoduje zmianę konformacji kolagenu, ułatwiając wiązanie FKBP65. Istnieją również doniesienia, że białko FKBP65 pełni rolę białka opiekuńczego w ER, natomiast jego aktywność jako peptydylo-prolilowej *cis-trans* izomerazy nie jest znacząca w tworzeniu potrójnej helisy prokolagenu [48,118]. Odkryte ostatnio mutacje w genie kodującym białko FKBP65 są przyczyną OI o fenotypie podobnym do IX typu choroby uwarunkowanego mutacjami w genie *PPIB*.

### ZNACZENIE 3-HYDROKSYLACJI INNYCH TYPÓW KOLAGENU

Wszystkie badania przyczyn OI koncentrują się na kolagenie typu I, natomiast brak lub redukcja ilości białek modyfikujących kolagen może się wiązać z zaburzeniem metabolizmu i funkcji również innych kolagenów, w modyfikacjach których biorą one udział. U myszy pozbawionej białka CRTAP wykazano nie tylko brak 3-hydroksylacji proliny w pozycji 986 w kolagenie typu I, ale również w kolagenie typu V i II [5]. Ponieważ kolagen typu V pełni ważną rolę w regulacji średnicy włókien kolagenowych [56], brak tej modyfikacji może mieć związek z nieprawidłową strukturą fibryli kolagenowych i zaburzoną ich mineralizacją. U dzieci z recesywną postacią OI jednym z objawów klinicznych jest silnie ograniczony wzrost, co może być skutkiem zmiany struktury i modyfikacji (m.in. braku 3-hydroksylacji) kolagenu typu II występującego głównie w chrząstce.

Weis i wsp. [111] próbowali określić miejsca 3-hydroksylacji proliny w innych kolagenach włóknkowych. Tylko 1–2 reszt 3-Hyp występuje w kolagenie typu I i II i 3–6 reszt w kolagenie typu V i XI; największa ich ilość występuje natomiast w kolagenie IV, w którym może stanowić 10%

zawartości reszt 4-Hyp. Oprócz reszt Pro986 w łańcuchach  $\alpha 1$  kolagenów typu I i II i  $\alpha 2$  kolagenu typu V, 3-hydroksylacji ulegają reszty proliny w pozycji 707 w łańcuchu  $\alpha 2$  kolagenu typu I,  $\alpha 1$  kolagenu typu II i łańcuchach  $\alpha 2$  kolagenu typu V oraz Pro944 w  $\alpha 1$ (II) i  $\alpha 2$ (V). W kolagene typu III, mimo występowania domeny konserwatywnej z resztą proliny w pozycji 992, nie wykryto tej modyfikacji u ludzi. Ze względu na specyficzne rozmieszczenie reszt 3-Hyp w odległości zbliżonej do okresu D, uważa się, że odgrywają one ważną rolę w tworzeniu struktur ponadcząsteczkowych przez tworzenie wiązań wodorowych między cząsteczkami kolagenu [91,111]. Takie interakcje mogą być również włączone w tworzenie dimerów prokolagenu [86], które są lepszym substratem C-propeptydazy prokolagenowej niż pojedyncze cząsteczki [44].

White i wsp. [112] wykazali wpływ zmian 4-hydroksylacji kolagenu w sekwencji GXPGER na swoistość wiązania kolagenu z powierzchniową komórki. Zmniejszenie lub brak ilości 3-Hyp, podobnie jak zmiany ilości 4-Hyp, może prowadzić do zaburzenia specyficznych interakcji kolagenu z białkami istotnymi w procesie tworzenia się kości i ich mineralizacji.

#### MUTACJE W GENACH KODUJĄCYCH BIAŁKA OPIEKUŃCZE KOLAGENU

Większość białek biorących udział w modyfikacjach posttranslacyjnych kolagenu spełnia jednocześnie rolę białek opiekuńczych, których zadaniem jest zapobieganie przedwczesnej agregacji i/lub nieswoistych interakcji łańcuchów prokolagenowych [20,70]. Niektóre z nich, np. HSP47 czy P4H są swoiste dla kolagenu, podczas gdy inne (kalneksyna, BiP, GRP94, PDI) są mniej swoiste [65,83]. U myszy pozbawionych genów niektórych białek opiekuńczych dochodziło do wzrostu retencji wewnątrzkomórkowej i degradacji kolagenu, a w konsekwencji do zmniejszonej ilości wydzielanego kolagenu [45,75].

#### HSP47 kodowane przez gen *SERPINH1*

HSP47 pełni rolę białka opiekuńczego prokolagenu typu I, jednak mechanizm jego działania nie jest dokładnie poznany [47,70,83]. Chociaż białko to może asocjować z łańcuchami prokolagenowymi, preferowanym substratem jest domena potrójnej helisy prokolagenu [60]. HSP47 wiąże się przejściowo z prokolagenem w ER i monitoruje integralność potrójnej helisy kolagenu w czasie jego wydzielania z ER do sieci cis aparatu Golgiego i tam oddysocjowuje; przy jego braku zwiększa się szybkość przemieszczenia kolagenu z ER do aparatu Golgiego i ulega zmianie jego konformacja. Wyłączenie genu *SERPINH1*, kodującego to białko, powoduje śmierć myszy w stadium embrjonalnym [82]. Ilość dojrzałego kolagenu była znacznie zredukowana we wszystkich tkankach mysich, a prokolagen typu I wydzielany przez fibroblasty był wrażliwy na nieswoiste proteazy w temperaturze 37°C. Prokolagen ulegał trawieniu w różnych miejscach, najwcześniej w regionie działania kolagenazy, sugerując że białko HSP47 wiąże się ze specyficznymi miejscami potrójnej helisy kolagenu; Koide i wsp. [60] sugerowali, że miejsca te są bogate w reszty argininy. Z powodu zmian strukturalnych prokolagenu w miejscu działania N-proteinyazy, sekrecja i konwersja prokolagenu typu I do tropokolagenu była również zaburzona [82].

Mutacja wykryta u pacjenta w genie *SERPINH1* (Leu78Pro) warunkowała OI o bardzo poważnym fenotypie typu III [27]. Białko opiekuńcze HSP47 ulegało degradacji z udziałem proteasomu, a prokolagen typu I akumulacji w aparacie Golgiego; ten który uległ sekrecji był, podobnie jak u myszy, wrażliwy na proteazy (podobnie kolagen typu III). Nie wykazano natomiast zmian w modyfikacjach posttranslacyjnych kolagenu. Jak zmiany w ekspresji HSP47 przekładają się na fenotyp OI pozostaje niejasne, prawdopodobnie wskutek nieprawidłowej struktury wydzielanego do ECM kolagenu może dojść do zaburzenia procesów fibrylogenezy i mineralizacji.

#### FKBP65 kodowane przez gen *FKBP10*

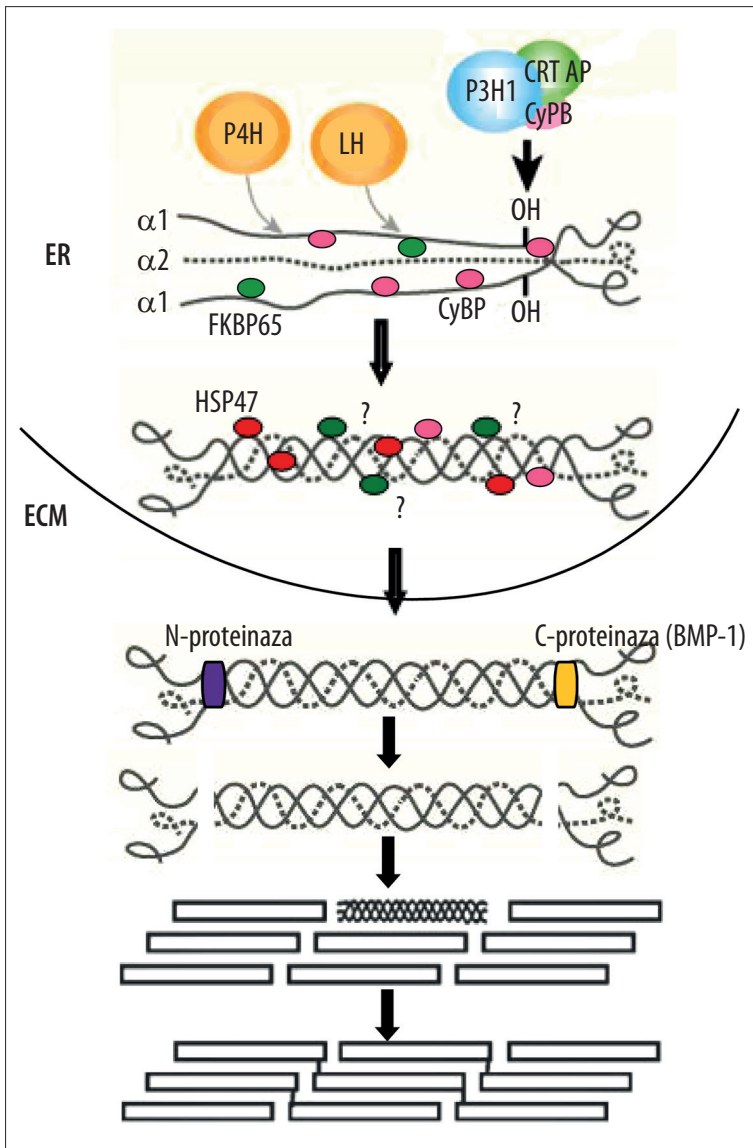
Innym białkiem, wiążącym się z kolagenem typu I, w którym wykryto mutację jest FKBP65 kodowane przez gen *FKBP10* [2,55]. Należy do rodziny białek FKBP, pełniących funkcję peptydylo-prolilowych cis-trans izomeraz i białek opiekuńczych. W nieobecności białka, podobnie jak w przypadku mutacji w genie kodującym HSP47, dochodzi do akumulacji wewnątrzkomórkowej kolagenu. Białko to, podobnie jak HSP47, wchodzi w interakcje zarówno z niesfałdowanymi łańcuchami, a także z potrójną helisą kolagenu i zapobiega przedwczesnej asocjacji cząsteczek prokolagenu w ER. Funkcje HSP47 nie mogą być jednak zastąpione przez FKBP65, ponieważ – jak już wspomniano – wyłączenie genu kodującego HSP47 u myszy jest letalne [82]. Fenotyp pacjentów z mutacjami w genie *FKBP10*, podobnie jak w genie *SERPINH1*, jest porównywalny do typu III o ciężkim przebiegu choroby, chociaż jest łagodniejszy niż w przypadku mutacji w genach kodujących składniki kompleksu (*CRTAP/LEPRE1/PP1B*) [55].

#### MUTACJA W GENIE KODUJĄCYM *BMP-1*

Metaloproteiny BMP1/mTLD odgrywają ważną rolę w regulacji aktywności i funkcji wielu białek syntetyzowanych w postaci nieaktywnych prekursorów [39]. Są odpowiedzialne za posttranslacyjną obróbkę i dojrzewanie wielu białek ECM. Białko morfogenetyczne kości 1 (BMP-1) pełni funkcję C-proteinyazy prokolagenu [EC 3.4.24.19], biorąc udział w usuwaniu C-końcowego propeptydu [67]. BMP-1 i jego dłuższa izoforma mTLD (mammalian Tolloid), nazwana z powodu podobieństwa strukturalnego do białka tolloid wykrytego u *Drosophila*, są produktami alternatywnego składania mRNA genu *BMP1*, zlokalizowanego na chromosomie 8p21.3 [96]. Białka BMP-1 i mTLD są zaliczane do grupy zwanej metaloproteiny BMP1/TLD-podobne, do której należą jeszcze dwa białka TLL1 (Tolloid-like protein 1) i TLL2 (Tolloid-like protein 2), kodowane przez geny umiejscowione na chromosomach 4 i 10. Chociaż wszystkie cztery białka mają aktywność C-proteinyazy prokolagenu, największą aktywność proteolityczną przy usuwaniu C-propeptydu prokolagenu typu I wykazuje BMP-1 [85]. Metaloproteiny BMP1/TLD-podobne biorą również udział w konwersji innych typów prokolagenów (II, III i V) do kolagenów oraz w aktywacji oksydazy lizylowej [14,39]. Ponadto, wiele innych czynników i białek wydzielanych do ECM (m.in. chordyna) są substratami tych enzymów [39].

U rodzeństwa z bardzo ciężkim przebiegiem choroby, porównywalnym z deformującym typem III, wykryto





Ryc. 1. Rola białek, w których wykryto mutacje w recesywnej OI, w syntezie i procesach potranslacyjnych kolagenu (schemat). Kompleks białek P3H1/CRTAP/CyPB uczestniczy w 3-hydroksylacji kolagenu w pozycji 986 i pełni rolę białek opiekuńczych kolagenu. CyPB wiąże się zarówno z pojedynczymi łańcuchami, biorąc udział w izomeryzacji wiązań peptydowych X-Pro (podobnie jak FKBP65) i inicjacji tworzenia potrójnej helisy, jak również z potrójną helisą kolagenu (razem z HSP47 i prawdopodobnie FKBP65) w celu jego ochrony w czasie wydzielania. Po wydzieleniu prokolagenu dochodzi do odcięcia propeptydów z udziałem N-proteinazy i C-proteinazy (białka BMP-1), a następnie asocjacji monomerów we włókna kolagenowe i ich stabilizacji wiązaniami poprzecznymi (skrótly wyjaśniono w tekście)

recesywną mutacją Phe249Leu, umiejscowioną w konserwatywnej domenie proteazy białka BMP1/mTLD [74]. Mutacja ta hamowała proteolityczną aktywność BMP-1 i upośledzała proces dojrzewania kolagenu. Monomery kolagenu typu I z nieodciętymi C-propeptydami nie mogą być wbudowane do włókien kolagenowych [53]. Jeżeli jednak ulegną asocjacji z cząsteczkami kolagenu o strukturze prawidłowej, zaburzają proces fibrylogenezy, a utworzone włókna kolagenowe charakteryzują się obniżoną wytrzymałością mechaniczną. Ponadto, ze względu na występowanie mutacji w domenie katalitycznej proteazy BMP1/mTLD, zaburzony zostaje prawdopodobnie proces proteolityczny innych białek (m.in. prokolagenów typu II, III i V) i aktywacji oksydazy lizylowej [39]. Fenotyp myszy pozbawionej genu *BMP-1* był łagodniejszy, nie stwierdzono deformacji kości, natomiast wspólnym objawem występującym u pacjentów z wykrytą mutacją i u myszy pozbawionej obu kopii genu *BMP1* była przepuklina pępkowa. Stopień upośledzenia procesu konwersji prokolagenu do kolagenu był również mniejszy u myszy, co mogło wynikać z zastąpienia funkcji BMP-1 przez inne proteazy z rodziny

metaloproteinaz BMP1/TLD-podobnych. Należy dodać, że mutacje występujące w łańcuchach pro- $\alpha 1$  lub pro- $\alpha 2$  prokolagenu typu I w miejscu rozpoznawanym i trawionym przez BMP-1 warunkują znacznie łagodniejszy fenotyp niż mutacje białka enzymatycznego BMP-1 [68]. Odkrycie mutacji w genie *BMP1*, warunkującej recesywną postać OI o bardzo ciężkim przebiegu choroby, podkreśla znaczącą rolę tego białka i procesów, w których bierze udział, w homeostazie kości.

Podsumowanie znaczenia białek, w których wykryto mutacje u pacjentów z *osteogenesis imperfecta*, w biosyntezie i procesach potranslacyjnych kolagenu przedstawia ryc. 1.

#### MUTACJE W GENACH KODUJĄCYCH BIAŁKA NIEWPŁYWAJĄCE NA KOLAGEN

##### PEDF kodowany przez gen *SERPINF1*

Odkrycia mutacji w OI dokonane w 2011 roku dotyczyły genu *SERPINF1* kodującego czynnik pochodzący

z nabłonka barwnikowego siatkówki (PEDF – pigment epithelium derived factor) [12,46,104]. Czynnikiem ten jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 50 kDa, należąca podobnie jak HSP47 do rodziny serpin – inhibitorów proteaz serynowych, aczkolwiek w przypadku tych białek nie wykazano aktywności inhibitorowej [29]. PEDF jest białkiem wielofunkcyjnym i jednym z najsilniejszych inhibitorów angiogenezy u ludzi [76,98]. Mutacje wykryte w genie *SERPINF1* u osób z wrodzoną łamliwością kości dowodzą również ważnej jego roli w homeostazie kości [12,46,104]. Fenotyp dzieci z mutacjami zerowymi (null) w tym genie jest podobny do OI typu III, występują złamania i deformacje kości długich, niski wzrost i znacznie obniżona gęstość kości. Wyniki badań histologicznych kości okazały się zbieżne z opisanymi w 2002 roku przez Glorieuxa i wsp. [43] w OI typu VI o nieznanym wówczas podłożu genetycznym. Podobnie jak opisane wyżej mutacje w białkach opiekuńczych, mutacje w PEDF nie wpływają na modyfikację potranslacyjnych kolagenu, natomiast w odróżnieniu od nich nie zmieniają struktury ani sekrecji kolagenu. W oparciu o te wyniki trudno wytłumaczyć dlaczego brak tego białka jest przyczyną łamliwości kości. Jak dotąd nie ma doniesień o jego funkcji wewnątrzkomórkowej jako białka opiekuńczego, wiadomo natomiast, że ulega sekrecji i akumulacji w ECM, wiążąc się m.in. z kolagenem typu I [76]. Badania ekspresji i roli PEDF dowiodły jego udziału w tworzeniu i remodelowaniu kości u myszy; ekspresję czynnika wykazano w osteoblastach, chondrocytach i w mniejszym stopniu w osteoklastach [1,98]. Czynnikiem PEDF hamuje różnicowanie osteoklastów i resorpcję kości poprzez regulację ekspresji osteoprotegeryny [1]. Jego silne działanie inhibitorowe przeciwstawia się z proangiogeniczną aktywnością czynnika VEGF (vascular endothelial growth factor). Po sekrecji i związaniu się PEDF z kolagenem istotny jest bilans między ekspresją obu czynników; brak PEDF może prowadzić do nadmiaru, w miejscach aktywnego remodelowania kości i w płycie nasadowej, komórek prekursorowych osteoklastów i wzmoczonej resorpcji kości [17,76]. Ponieważ u osób z typem VI OI występują zaburzenia mineralizacji, możliwe że PEDF odgrywa rolę w regulacji tego procesu [46].

### Czynnik transkrypcyjny SP7/Osterix

Ostatnim genem, w którym wykryto mutację u dziecka z objawami OI jest gen *SP7/OSX* kodujący czynnik transkrypcyjny SP7/Osterix o istotnym znaczeniu w dojrzewaniu i funkcjonowaniu osteoblastów i procesie kościotworzenia [66]. U myszy z wyłączonym genem *SP7/OSX* wykazano obniżoną ekspresję markerów kościotworzenia

i nie dochodziło do różnicowania osteoblastów [84]. Charakterystyczną cechą kliniczną, zarówno u myszy pozabawionej genu jak i u dziecka z wykrytą mutacją w tym genie, było znaczne wygięcie kości [66]. Osterix jest białkiem charakteryzującym się obecnością trzech tandemów domen Cys2-His2 wiążących DNA i zawierających palec cynkowy w ich C-końcu [38]. Mutacja wykryta u dziecka dotyczyła delecji 81 aminokwasów od C-końca, włączając w nie motyw trzeciego palca cynkowego [66]. Zmutowany czynnik ulega degradacji z udziałem proteasomu, jeżeli jednak nie ulegnie całkowitej degradacji, jego wiązanie z DNA może ulec zmianie, a w konsekwencji zaburzona zostanie regulacja transkrypcji genów swoistych dla osteoblastów. Odkrycie to dodaje nowe *locus* do różnorodnych genów warunkujących OI i ujawnia, że *SP7/OSX* odgrywa znaczącą rolę w rozwoju kości również u ludzi.

### PODSUMOWANIE

Mechanizmy włączone w patogenezę OI z mutacjami w genach niekolagenowych są jeszcze słabo poznane. Początkowo sądzono, że brak 3-hydroksylacji kolagenu typu I, wskutek mutacji białek kompleksu P3H1/CRTAP/CYPB, stanowi zasadniczy element patomechanizmu, jednakże wykazana aktywność białek kompleksu jako białek opiekuńczych wydaje się mieć dominujące znaczenie. Brak aktywności tego kompleksu czy innych białek opiekuńczych: HSP47 i FKBP65 wpływa destrukcyjnie na jakość syntetyzowanego kolagenu i jego funkcje; może też spowodować stres w ER i apoptozę komórek. Brak lub redukcja ilości tych białek może się wiązać z zaburzeniem metabolizmu i funkcji również innych kolagenów, w modyfikacjach których biorą one udział. Fenotyp osób z mutacjami genów niekolagenowych jest porównywalny do najcięższego przeżywalnego i letalnego typu choroby uwarunkowanego mutacjami genów kolagenowych. Mutacja białka BMP-1, wykazującego właściwości proteolityczne, warunkuje dużo gorszy fenotyp niż mutacje występujące w prokolagenie typu I w miejscu działania enzymu. W świetle ostatnich odkryć mutacji w genach *SERPINF1* i *SP7/OSX* w fenotyp OI wydaje się być włączony patomechanizm niezwiązany ze zmianami w syntezie i procesach potranslacyjnych kolagenu. Ponieważ większość białek, w których wykryto mutacje, pełni wiele niezależnych funkcji zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowych, fenotyp „kruchych kości” może wynikać z zaburzeń procesów jeszcze niepoznanych a determinujących strukturę i wytrzymałość mechaniczną kości. Trzeba dodać, że w znacznej grupie chorych, u których nie wykryto mutacji w genach kolagenowych, podłoże molekularne nie jest dotąd znane.

### PIŚMIENNICTWO

- [1] Akiyama T., Dass C.R., Shinoda Y., Kawano H., Tanaka S., Choong P.F.: PEDF regulates osteoclasts via osteoprotegerin and RANKL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010; 391: 789–794
- [2] Alanay Y., Avaygan H., Camacho N., Utine G.E., Boduroglu K., Aktas D., Alikasifoglu M., Tuncbilek E., Orhan D., Bakar F.T., Zabel B., Superti-Furga A., Bruckner-Tuderman L., Curry C.J., Pyott S., Byers P.H., Eyre D.R., Baldrige D., Lee B., Merrill A.E., Davis E.C., Cohn D.H., Akarsu N., Krakow D.: Mutations in the gene encoding the RER protein FKBP65 cause autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *Am. J. Hum. Genet.*, 2010; 86: 551–559
- [3] Amor I.M., Rauch F., Gruenwald K., Weis M., Eyre D.R., Roughley P., Glorieux F.H., Morello R.: Severe osteogenesis imperfecta caused by a small in-frame deletion in CRTAP. *Am. J. Med. Genet. A*, 2011; 155A: 2865–2870
- [4] Bächinger H.P.: The influence of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase on the *in vitro* folding of type III collagen. *J. Biol. Chem.*, 1987; 262: 17144–17148
- [5] Baldrige D., Lenington J., Weis M., Homan E.P., Jiang M.M., Munivez E., Keene D.R., Hogue W.R., Pyott S., Byers P.H., Krakow D., Cohn D.H., Eyre D.R., Lee B., Morello R.: Generalized connective tissue disease in *Crtap*<sup>-/-</sup> mouse. *PLoS One*, 2010; 5: e10560

- [6] Baldrige D., Schwarze U., Morello R., Lenington J., Bertin T.K., Pace J.M., Pepin M.G., Weis M., Eyre D.R., Walsh J., Lambert D., Green A., Robinson H., Michelson M., Houge G., Lindman C., Martin J., Ward J., Lemyre E., Mitchell J.J., Krakow D., Rimo D.L., Cohn D.H., Byers P.H., Lee B.: CRTAP and LEPRE1 mutations in recessive osteogenesis imperfecta. *Hum. Mutat.*, 2008; 29: 1435–1442
- [7] Barnes A.M., Carter E.M., Cabral W.A., Weis M., Chang W., Makareeva E., Leikin S., Rotimi C.N., Eyre D.R., Raggio C.L., Marini J.C.: Lack of cyclophilin B in osteogenesis imperfecta with normal collagen folding. *N. Engl. J. Med.*, 2010; 362: 521–528
- [8] Barnes A.M., Chang W., Morello R., Cabral W.A., Weis M., Eyre D.R., Leikin S., Makareeva E., Kuznetsova N., Uveges T.E., Ashok A., Flor A.W., Mulvihill J.J., Wilson P.L., Sundaram U.T., Lee B., Marini J.C.: Deficiency of cartilage-associated protein in recessive lethal osteogenesis imperfecta. *N. Engl. J. Med.*, 2006; 355: 2757–2764
- [9] Barsh G.S., David K.E., Byers P.H.: Type I osteogenesis imperfecta: a nonfunctional allele for pro $\alpha$ 1(I) chains of type I procollagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982; 79: 3838–3842
- [10] Bateman J.F., Boot-Handford R.P., Lamandé S.R.: Genetic diseases of connective tissues: cellular and extracellular effects of ECM mutations. *Nat. Rev. Genet.*, 2009; 10: 173–183
- [11] Beck K., Chan V.C., Shenoy N., Kirkpatrick A., Ramshaw J.A., Brodsky B.: Destabilization of osteogenesis imperfecta collagen-like model peptides correlates with the identity of the residue replacing glycine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 4273–4278
- [12] Becker J., Semler O., Gillissen C., Li Y., Bolz H.J., Giunta C., Bergmann C., Rohrbach M., Koerber F., Zimmermann K., de Vries P., Wirth B., Schoenau E., Wollnik B., Veltman J.A., Hoischen A., Netzer C.: Exome sequencing identifies truncating mutations in human SERPINF1 in autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *Am. J. Hum. Genet.*, 2011; 88: 362–371
- [13] Berg R.A., Prockop D.J.: The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973; 52: 115–120
- [14] Bonod-Bidaud C., Beraud M., Vaganay E., Delacoux F., Font B., Hulmes D.J., Ruggiero F.: Enzymatic cleavage specificity of the pro- $\alpha$ 1(V) chain processing analysed by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.*, 2007; 405: 299–306
- [15] Bornstein P.: Covalent cross-links in collagen: a personal account of their discovery. *Matrix Biol.*, 2003; 22: 385–391
- [16] Boskey A.L., Wright T.M., Blank R.D.: Collagen and bone strength. *J. Bone Miner. Res.*, 1999; 14: 330–335
- [17] Broadhead M.L., Akiyama T., Choong P.F., Dass C.R.: The pathophysiological role of PEDF in bone diseases. *Curr. Mol. Med.*, 2010; 10: 296–301
- [18] Byers P.H.: Brittle bones – fragile molecules: disorders of collagen gene structure and expression. *Trends Genet.*, 1990; 6: 293–300
- [19] Cabral W.A., Chang W., Barnes A.M., Weis M., Scott M.A., Leikin S., Makareeva E., Kuznetsova N.V., Rosenbaum K.N., Tift C.J., Bulas D.I., Kozma C., Smith P.A., Eyre D.R., Marini J.C.: Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nat. Genet.*, 2007; 39: 359–365
- [20] Cauty E.G., Kadler K.E.: Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J. Cell Sci.*, 2005; 118: 1341–1353
- [21] Capellini T.D., Dunn M.P., Passamanek Y.J., Selleri L., Di Gregorio A.: Conservation of notochord gene expression across chordates: insights from the Lepreca gene family. *Genesis*, 2008; 46: 683–696
- [22] Castagnola P., Gennari M., Morello R., Tonachini L., Marin O., Gaggero A., Cancedda R.: Cartilage associated protein (CASP) is a novel developmentally regulated chick embryo protein. *J. Cell Sci.*, 1997; 110: 1351–1359
- [23] Chang W., Barnes A.M., Cabral W.A., Bodurtha J.N., Marini J.C.: Prolyl 3-hydroxylase 1 and CRTAP are mutually stabilizing in the endoplasmic reticulum collagen prolyl 3-hydroxylation complex. *Hum. Mol. Genet.*, 2010; 19: 223–234
- [24] Chessler S.D., Byers P.H.: BiP binds type I procollagen pro $\alpha$  chains with mutations in the carboxyl-terminal propeptide synthesized by cells from patients with osteogenesis imperfecta. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 18226–18233
- [25] Cheung M.S., Glorieux F.H.: Osteogenesis imperfecta: update on presentation and management. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 2008; 9: 153–160
- [26] Choi J.W., Sutor S.L., Lindquist L., Evans G.L., Madden B.J., Bergen H.R. III, Hefferan T.E., Yaszenski M.J., Bram R.J.: Severe osteogenesis imperfecta in cyclophilin B-deficient mice. *PLoS Genet.*, 2009; 5: e1000750
- [27] Christiansen H.E., Schwarze U., Pyott S.M., AlSwaied A., Al Balwi M., Alrasheed S., Pepin M.G., Weis M.A., Eyre D.R., Byers P.H.: Homozygosity for a missense mutation in SERPINH1, which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive osteogenesis imperfecta. *Am. J. Hum. Genet.*, 2010; 86: 389–398
- [28] Cole W.G.: Collagen genes: Mutations affecting collagen structure and expression. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 1994; 47: 29–80
- [29] Filleul S., Nelius T., de Riese W., Kennedy R.C.: Characterization of PEDF: a multi-functional serpin family protein. *J. Cell. Biochem.*, 2009; 106: 769–775
- [30] Fitzgerald J., Lamandé S.R., Bateman J.F.: Proteasomal degradation of unassembled mutant type I collagen pro- $\alpha$ 1(I) chains. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 27392–27398
- [31] Forlino A., Cabral W.A., Barnes A.M., Marini J.C.: New perspectives on osteogenesis imperfecta. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2011; 7: 540–557
- [32] Gajko-Galicka A.: Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. *Acta Biochim. Pol.*, 2002; 49: 433–441
- [33] Galat A., Metcalfe S.M.: Peptidylproline cis/trans isomerases. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1995; 63: 67–118
- [34] Galicka A., Bielawski T., Gindzieński A., Średzińska K.: Diagnostyka molekularna wrodzonej łamliwości kości typu I. *Pol. Merkur. Lekarski*, 2008; 148: 345–348
- [35] Galicka A., Wołczyński S., Gindzieński A.: Studies on type I collagen in skin fibroblasts cultured from twins with lethal osteogenesis imperfecta. *Acta Biochim. Pol.*, 2003; 50: 481–488
- [36] Galicka A., Wołczyński S., Gindzieński A., Surazylski A., Pałka J.: Gly511 to Ser substitution in the COL1A1 gene in osteogenesis imperfecta type III patient with increased turnover of collagen. *Mol. Cell. Biochem.*, 2003; 248: 49–56
- [37] Galicka A., Wołczyński S., Leśniewicz R., Chyczewski L., Gindzieński A.: A novel Gly to Arg substitution at position 388 of the  $\alpha$ 1 chain of type I collagen in lethal form of osteogenesis imperfecta. *Acta Biochim. Pol.*, 2002; 49: 443–450
- [38] Gao Y., Jheon A., Nourkeyhani H., Kobayashi H., Ganss B.: Molecular cloning, structure, expression, and chromosomal localization of the human Osterix (SP7) gene. *Gene*, 2004; 341: 101–110
- [39] Ge G., Greenspan D.S.: Developmental roles of the BMP1/TLD metalloproteinases. *Birth Defects Res. C Embryo Today*, 2006; 78: 47–68
- [40] Glorieux F.H.: Osteogenesis imperfecta. A disease of the osteoblast. *Lancet*, 2001; 358 (Suppl.): S45
- [41] Glorieux F.H.: Osteogenesis imperfecta. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2008; 22: 85–100
- [42] Glorieux F.H., Rauch F., Plotkin H., Ward L., Travers R., Roughley P., Lalic L., Glorieux D.F., Fassier F., Bishop N.J.: Type V osteogenesis imperfecta: a new form of brittle bone disease. *J. Bone Miner. Res.*, 2000; 15: 1650–1658
- [43] Glorieux F.H., Ward L.M., Rauch F., Lalic L., Roughley P.J., Travers R.: Osteogenesis imperfecta type VI: a form of brittle bone disease with a mineralization defect. *J. Bone Miner. Res.*, 2002; 17: 30–38
- [44] Hojima Y., Behta B., Romanic A.M., Prockop D.J.: Cleavage of type I procollagen by C- and N-proteinases is more rapid if the substrate is aggregated with dextran sulfate or polyethylene glycol. *Anal. Biochem.*, 1994; 223: 173–180
- [45] Holster T., Pakkanen O., Soiminen R., Sormunen R., Nokelainen M., Kivirikko K.I., Myllyharju J.: Loss of assembly of the main basement membrane collagen, type IV, but not fibril-forming collagens and embryonic death in collagen prolyl 4-hydroxylase I null mice. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 2512–2519
- [46] Homan E.P., Rauch F., Grafe I., Lietman C., Doll J.A., Dawson B., Bertin T., Napierala D., Morello R., Gibbs R., White L., Miki R., Cohn D.H., Crawford S., Travers R., Glorieux F.H., Lee B.: Mutations in SERPINF1 cause osteogenesis imperfecta type VI. *J. Bone Miner. Res.*, 2011; 26: 2798–2803
- [47] Ishida Y., Kubota H., Yamamoto A., Kitamura A., Bächinger H.P., Nagata K.: Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in endoplasmic reticulum and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis. *Mol. Biol. Cell*, 2006; 17: 2346–2355
- [48] Ishikawa Y., Wirz J., Vranka J.A., Nagata K., Bächinger H.P.: Biochemical characterization of the prolyl 3-hydroxylase 1, cartilage-associated protein, cyclophilin B complex. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 17641–17647

- [49] Järnum S., Kjellman C., Darabi A., Nilsson I., Edvardsen K., Aman P.: LEPREL1, a novel ER and Golgi resident member of the Leprecan family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 317: 342–351
- [50] Jenkins C.L., Bretscher L.E., Guzei I.A., Raines R.T.: Effect of 3-hydroxyproline residues on collagen stability. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003; 125: 6422–6427
- [51] Kadler K.E., Baldock C., Bella J., Boot-Handford R.P.: Collagens at a glance. *J. Cell Sci.*, 2007; 120: 1955–1958
- [52] Kadler K.E., Hill A., Canty-Laird E.G.: Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2008; 20: 495–501
- [53] Kadler K.E., Hulmes D.J., Hojima Y., Prockop D.J.: Assembly of type I collagen fibrils *de novo* by the specific enzymic cleavage of pC collagen. The fibrils formed at about 37 degrees C are similar in diameter, roundness, and apparent flexibility to the collagen fibrils seen in connective tissue. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1990; 580: 214–224
- [54] Kaul S.C., Sugihara T., Yoshida A., Nomura H., Wadhwa R.: Gros1, a potential growth suppressor on chromosome 1: its identity to basement membrane-associated proteoglycan, leprecan. *Oncogene*, 2000; 19: 3576–3583
- [55] Kelley B.P., Malfait F., Bonafe L., Baldrige D., Homan E., Symoens S., Willaert A., Elcioglu N., Van Maldergem L., Verellen-Dumoulin C., Gillero Y., Napierala D., Krakow D., Beighton P., Superti-Furga A., De Paepe A., Lee B.: Mutations in FKBP10 cause recessive osteogenesis imperfecta and Bruck syndrome. *J. Bone Miner. Res.*, 2011; 26: 666–672
- [56] Kielty C.M., Grant M.E.: The collagen family: Structure, assembly, and organization in the extracellular matrix. W: *Connective Tissue and its Heritable Disorders*, red.: P.M. Royce, B. Steinmann. Wiley-Liss, New York 2002, 159–221
- [57] Kivirikko K.I., Myllyharju J.: Prolyl 4-hydroxylases and their protein disulfide isomerase subunit. *Matrix Biol.*, 1998; 16: 357–368
- [58] Kivirikko K.I., Myllylä R.: Post-translational processing of procollagens. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1985; 460: 187–201
- [59] Ko M.K., Kay E.P.: PDI-mediated ER retention and proteasomal degradation of procollagen I in corneal endothelial cells. *Exp. Cell Res.*, 2004; 295: 25–35
- [60] Koide T., Nishikawa Y., Asada S., Yamazaki C.M., Takahara Y., Homma D.L., Otaka A., Ohtani K., Wakamiya N., Nagata K., Kitagawa K.: Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. II. The HSP47-binding structural motif in collagens and related proteins. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 11177–11185
- [61] Koivu J.: Identification of disulfide bonds in carboxy-terminal peptides of human type I procollagen. *FEBS Lett.*, 1987; 212: 229–232
- [62] Kozlov G., Bastos-Arístizabal S., Määttäinen P., Rosenauer A., Zheng F., Killikelly A., Trempe J.F., Thomas D.Y., Gehring K.: Structural basis of cyclophilin B binding by the calnexin/calreticulin P-domain. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 35551–35557
- [63] Kuivaniemi H., Tromp G., Prockop D.J.: Mutations in collagen genes: causes of rare and some common diseases in humans. *FASEB J.*, 1991; 5: 2052–2060
- [64] Kukkola L., Hieta R., Kivirikko K.I., Myllyharju J.: Identification and characterization of a third human, rat, and mouse collagen prolyl 4-hydroxylase isoenzyme. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 47685–47693
- [65] Lamandé S.R., Bateman J.F.: Procollagen folding and assembly: the role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 1999; 10: 455–464
- [66] Lapunzina P., Aglan M., Temtamy S., Caparrós-Martín J.A., Valencia M., Letón R., Martínez-Glez V., Elhossini R., Amr K., Vilaboa N., Ruiz-Perez V.L.: Identification of a frameshift mutation in Osterix in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. *Am. J. Hum. Genet.*, 2010; 87: 110–114
- [67] Li S.W., Sieron A.L., Fertala A., Hojima Y., Arnold W.V., Prockop D.J.: The C-proteinase that processes procollagens to fibrillar collagens is identical to the protein previously identified as bone morphogenic protein-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 5127–5130
- [68] Lindahl K., Barnes A.M., Fratzl-Zelman N., Whyte M.P., Hefferan T.E., Makareeva E., Brusel M., Yaszemski M.J., Rubin C.J., Kindmark A., Roschger P., Klaushofer K., McAlister W.H., Mumm S., Leikin S., Kessler E., Boskey A.L., Ljunggren O., Marini J.C.: COL1 C-propeptide cleavage site mutations cause high bone mass osteogenesis imperfecta. *Hum. Mutat.*, 2011; 32: 598–609
- [69] Lisse T.S., Thiele F., Fuchs H., Hans W., Przemek G.K., Abe K., Rathkolb B., Quintanilla-Martinez L., Hoelzlwimmer G., Helfrich M., Wolf E., Ralston S.H., Hrabě de Angelis M.: ER stress-mediated apoptosis in a new mouse model of osteogenesis imperfecta. *PLoS Genet.*, 2008; 4: e7
- [70] Makareeva E., Aviles N.A., Leikin S.: Chaperoning osteogenesis: new protein-folding disease paradigms. *Trends Cell Biol.*, 2011; 21: 168–176
- [71] Marini J.C., Cabral W.A., Barnes A.M.: Null mutations in *LEPRE1* and *CRTAP* cause severe recessive osteogenesis imperfecta. *Cell Tissue Res.*, 2010; 339: 59–70
- [72] Marini J.C., Cabral W.A., Barnes A.M., Chang W.: Components of the collagen prolyl 3-hydroxylation complex are crucial for normal bone development. *Cell Cycle*, 2007; 6: 1675–1681
- [73] Marini J.C., Forlino A., Cabral W.A., Barnes A.M., San Antonio J.D., Milgrom S., Hyland J.C., Körkkö J., Prockop D.J., De Paepe A., Coucke P., Symoens S., Glorieux F.H., Roughley P.J., Lund A.M., Kuurila-Svahn K., Hartikka H., Cohn D.H., Krakow D., Mottes M., Schwarze U., Chen D., Yang K., Kuslich C., Troendle J., Dalgleish R., Byers P.H.: Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum. Mutat.*, 2007; 28: 209–221
- [74] Martínez-Glez V., Valencia M., Caparrós-Martín J.A., Aglan M., Temtamy S., Tenorio J., Pulido V., Lindert U., Rohrbach M., Eyre D., Giunta C., Lapunzina P., Ruiz-Perez V.L.: Identification of a mutation causing deficient BMP1/mTLD proteolytic activity in autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Hum. Mutat.*, 2012; 33: 343–350
- [75] Marutani T., Yamamoto A., Nagai N., Kubota H., Nagata K.: Accumulation of type IV collagen in dilated ER leads to apoptosis in Hsp47-knockout mouse embryos via induction of CHOP. *J. Cell Sci.*, 2004; 117: 5913–5922
- [76] Meyer C., Notari L., Becerra S.P.: Mapping the type I collagen-binding site on pigment epithelium-derived factor. Implications for its antiangiogenic activity. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 45400–45407
- [77] Mizuno K., Peyton D.H., Hayashi T., Engel J., Bächinger H.P.: Effect of the –Gly-3(S)-hydroxyprolyl-4(R)-hydroxyprolyl- tripeptide unit on the stability of collagen model peptides. *FEBS J.*, 2008; 275: 5830–5840
- [78] Morello R., Bertin T.K., Chen Y., Hicks J., Tonachini L., Monticone M., Castagnola P., Rauch F., Glorieux F.H., Vranka J., Bächinger H.P., Pace J.M., Schwarze U., Byers P.H., Weis M., Fernandes R.J., Eyre D.R., Yao Z., Boyce B.F., Lee B.: CRTAP is required for prolyl 3-hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. *Cell*, 2006; 127: 291–304
- [79] Morello R., Rauch F.: Role of cartilage-associated protein in skeletal development. *Curr. Osteoporos. Rep.*, 2010; 8: 77–83
- [80] Morello R., Tonachini L., Monticone M., Viggiano L., Rocchi M., Cancedda R., Castagnola P.: cDNA cloning, characterization and chromosome mapping of Crtp encoding the mouse cartilage associated protein. *Matrix Biol.*, 1999; 18: 319–324
- [81] Myllyharju J., Kivirikko K.I.: Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.*, 2004; 20: 33–43
- [82] Nagai N., Hosokawa M., Itohara S., Adachi E., Matsushita T., Hosokawa N., Nagata K.: Embryonic lethality of molecular chaperone hsp47 knockout mice is associated with defects in collagen biosynthesis. *J. Cell Biol.*, 2000; 150: 1499–1506
- [83] Nagata K.: HSP47 as a collagen-specific molecular chaperone: function and expression in normal mouse development. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2003; 14: 275–282
- [84] Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng J.M., Behringer R.R., de Crombrugge B.: The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 2002; 108: 17–29
- [85] Pappano W.N., Steiglit B.M., Scott I.C., Keene D.R., Greenspan D.S.: Use of Bmp1/Tll1 doubly homozygous null mice and proteomics to identify and validate *in vivo* substrates of bone morphogenetic protein 1/tolloid-like metalloproteinases. *Mol. Cell Biol.*, 2003; 23: 4428–4438
- [86] Polishchuk E.V., Di Pentima A., Luini A., Polishchuk R.S.: Mechanism of constitutive export from the Golgi: bulk flow via the formation, protrusion, and en bloc cleavage of large trans-Golgi network tubular domains. *Mol. Biol. Cell*, 2003; 14: 4470–4485
- [87] Prockop D.J.: Osteogenesis imperfecta: phenotypic heterogeneity, protein suicide, short and long collagen. *Am. J. Hum. Genet.*, 1984; 36: 499–505
- [88] Prockop D.J., Sieron A.L., Li S.W.: Procollagen N-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that are essential for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling. *Matrix Biol.*, 1998; 16: 399–408
- [89] Pyott S.M., Schwarze U., Christiansen H.E., Pepin M.G., Leistritz D.F., Dineen R., Harris C., Burton B.K., Angle B., Kim K., Sussman M.D., Weis M., Eyre D.R., Russell D.W., McCarthy K.J., Steiner R.D., Byers P.H.: Mutations in PPIB (cyclophilin B) delay type I procollagen chain association and result in perinatal lethal to moderate osteogenesis imperfecta phenotypes. *Hum. Mol. Genet.*, 2011; 20: 1595–1609

- [90] Rycyzyn M.A., Reilly S.C., O'Malley K., Clevenger C.V.: Role of cyclophilin B in prolactin signal transduction and nuclear retrotranslocation. *Mol. Endocrinol.*, 2000; 14: 1175–1186
- [91] Schumacher M.A., Mizuno K., Bächinger H.P.: The crystal structure of a collagen-like polypeptide with 3(S)-hydroxyproline residues in the Xaa position forms a standard 7/2 collagen triple helix. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 27566–27574
- [92] Silience D.O., Rimoin D.L.: Classification of osteogenesis imperfecta. *Lancet*, 1978; 1: 1041–1042
- [93] Silience D.O., Senn A., Danks D.M.: Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *J. Med. Genet.*, 1979; 16: 101–116
- [94] Smith T., Ferreira L.R., Hebert C., Norris K., Sauk J.J.: Hsp47 and cyclophilin B traverse the endoplasmic reticulum with procollagen into pre-Golgi intermediate vesicles. A role for Hsp47 and cyclophilin B in the export of procollagen from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 18323–18328
- [95] Steinmann B., Bruckner P., Superti-Furga A.: Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation *in vivo*: indirect evidence for a physiologic role of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266: 1299–1303
- [96] Takahara K., Lyons G.E., Greenspan D.S.: Bone morphogenetic protein-1 and a mammalian tolloid homologue (mTld) are encoded by alternatively spliced transcripts which are differentially expressed in some tissues. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 32572–32578
- [97] Tiainen P., Pasanen A., Sormunen R., Myllyharju J.: Characterization of recombinant human prolyl 3-hydroxylase isoenzyme 2, an enzyme modifying the basement membrane collagen IV. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 19432–19439
- [98] Tombran-Tink J., Barnstable C.J.: Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 316: 573–579
- [99] Tonachini L., Morello R., Monticone M., Skaug J., Scherer S.W., Cancedda R., Castagnola P.: cDNA cloning, characterization and chromosome mapping of the gene encoding human cartilage associated protein (CRTAP). *Cytogenet. Cell Genet.*, 1999; 87: 191–194
- [100] Torre-Blanco A., Adachi E., Hojima Y., Wootton J.A., Minor R.R., Prockop D.J.: Temperature-induced post-translational over-modification of type I procollagen. Effects of over-modification of the protein on the rate of cleavage by procollagen N-proteinase and on self-assembly of collagen into fibrils. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 2650–2655
- [101] Tryon R.C., White S.D., Famula T.R., Schultheiss P.C., Hamar D.W., Bannasch D.L.: Inheritance of hereditary equine regional dermal asthenia in Quarter Horses. *Am. J. Vet. Res.*, 2005; 66: 437–442
- [102] van Dijk F.S., Nesbitt I.M., Zwikstra E.H., Nikkels P.G., Piersma S.R., Fratantoni S.A., Jimenez C.R., Huizer M., Morsman A.C., Cobben J.M., van Roij M.H., Elting M.W., Verbeke J.I., Wijnaendts L.C., Shaw N.J., Högl W., McKeown C., Sistermans E.A., Dalton A., Meijers-Heijboer H., Pals G.: PPIB mutations cause severe osteogenesis imperfecta. *Am. J. Hum. Genet.*, 2009; 85: 521–527
- [103] Van Dijk F.S., Pals G., Van Rijn R.R., Nikkels P.G., Cobben J.M.: Classification of osteogenesis imperfecta revisited. *Eur. J. Med. Genet.*, 2010; 53: 1–5
- [104] Venturi G., Gandini A., Monti E., Dalle Carbonare L., Corradi M., Vincenzi M., Valenti M.T., Valli M., Pelilli E., Boner A., Mottes M., Antoniazzi F.: Lack of expression of SERPINF1, the gene coding for pigment epithelium-derived factor, causes progressively deforming osteogenesis imperfecta with normal type I collagen. *J. Bone Miner. Res.*, 2012; 27: 723–728
- [105] Venturi G., Tedeschi E., Mottes M., Valli M., Camilot M., Viglio S., Antoniazzi F., Tato L.: Osteogenesis imperfecta: clinical, biochemical and molecular findings. *Clin. Genet.*, 2006; 70: 131–139
- [106] Vranka J., Stadler H.S., Bächinger H.P.: Expression of prolyl 3-hydroxylase genes in embryonic and adult mouse tissues. *Cell Struct. Funct.*, 2009; 34: 97–104
- [107] Vranka J.A., Pokidysheva E., Hayashi L., Zientek K., Mizuno K., Ishikawa Y., Maddox K., Tufa S., Keene D.R., Klein R., Bächinger H.P.: Prolyl 3-hydroxylase 1 null mice display abnormalities in fibrillar collagen-rich tissues such as tendons, skin, and bones. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 17253–17262
- [108] Vranka J.A., Sakai L.Y., Bächinger H.P.: Prolyl 3-hydroxylase 1, enzyme characterization and identification of a novel family of enzymes. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 23615–23621
- [109] Ward L.M., Rauch F., Travers R., Chabot G., Azouz E.M., Lalic L., Roughley P.J., Glorieux F.H.: Osteogenesis imperfecta type VII: an autosomal recessive form of brittle bone disease. *Bone*, 2002; 31: 12–18
- [110] Wassenhove-McCarthy D.J., McCarthy K.J.: Molecular characterization of a novel basement membrane-associated proteoglycan, leprecan. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 25004–25017
- [111] Weis M.A., Hudson D.M., Kim L., Scott M., Wu J.J., Eyre D.R.: Location of 3-hydroxyproline residues in collagen types I, II, III, and V/XI implies a role in fibril supramolecular assembly. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 2580–2590
- [112] White D.J., Puranen S., Johnson M.S., Heino J.: The collagen receptor subfamily of the integrins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2004; 36: 1405–1410
- [113] Willaert A., Malfait F., Symoens S., Gevaert K., Kayserili H., Megarbane A., Mortier G., Leroy J.G., Coucke P.J., De Paep A.: Recessive osteogenesis imperfecta caused by LEPRE1 mutations: clinical documentation and identification of the splice form responsible for prolyl 3-hydroxylation. *J. Med. Genet.*, 2009; 46: 233–241
- [114] Willing M.C., Deschenes S.P., Scott D.A., Byers P.H., Slayton R.L., Pitts S.H., Arikat H., Roberts E.J.: Osteogenesis imperfecta type I: molecular heterogeneity for COL1A1 null alleles of type I collagen. *Am. J. Hum. Genet.*, 1994; 55: 638–647
- [115] Wilson R., Freddi S., Chan D., Cheah K.S., Bateman J.F.: Misfolding of collagen X chains harboring Schmid metaphyseal chondrodysplasia mutations results in aberrant disulfide bond formation, intracellular retention, and activation of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 15544–15552
- [116] Yamauchi M., Shiiba M.: Lysine hydroxylation and crosslinking of collagen. *Methods Mol. Biol.*, 2002; 194: 277–290
- [117] Yao Q., Li M., Yang H., Chai H., Fisher W., Chen C.: Roles of cyclophilins in cancers and other organ systems. *World J. Surg.*, 2005; 29: 276–280
- [118] Zeng B., MacDonald J.R., Bann J.G., Beck K., Gambee J.E., Boswell B.A., Bächinger H.P.: Chicken FK506-binding protein, FKBP65, a member of the FKBP family of peptidylprolyl cis-trans isomerases, is only partially inhibited by FK506. *Biochem. J.*, 1998; 330: 109–114

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.