

Received: 2008.02.06  
Accepted: 2008.03.25  
Published: 2008.04.18

## Molekularna charakterystyka guzów *leiomyoma uteri* na przykładzie wybranych składników macierzy pozakomórkowej\*

Molecular characteristics of *leiomyoma uteri* based on selected compounds of the extracellular matrix

Aleksandra Auguściak-Duma, Aleksander L. Sieroń

Katedra i Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki, Śląski Uniwersytet Medyczny

### Streszczenie

Mięśniak gładkokomórkowy macicy (*Leiomyoma uteri*) jest niezłośliwym nowotworem monoklonalnym złożonym z komórek mięśni gładkich i zrębu zbudowanego z włóknistej tkanki łącznej. Najczęściej jest umiejscowiony w błonie mięśniowej macicy u kobiet w wieku rozrodczym. Czynniki mogące przyspieszać jego wzrost są ciąża i terapia hormonalna. Jest to także guz pośrednio zależny od stężenia hormonów płciowych. W jego powstawaniu uczestniczą czynniki wzrostu i cytokiny. Modulacja aktywności mitotycznej, przerost komórek oraz nadmierne gromadzenie macierzy pozakomórkowej to główne przyczyny wzrostu leiomyoma. Najważniejszym czynnikiem proliferacyjnym komórek nowotworowych w leiomyoma uteri są czynniki z nadrodziny TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$ 1 i - $\beta$ 3 pobudzają syntezę różnorodnych składników macierzy pozakomórkowej oraz hamują syntezę enzymów degradujących macierz, co prowadzi do nadmiernego i nieprawidłowego rozrostu tkanki.

Głównym składnikiem macierzy pozakomórkowej są kolageny typu 1 i 3. Biosynteza kolagenów wymaga m.in. aktywności C-endopeptydazy prokolagenu (białka podrodziny BMP-1/mTLD). BMP-1/mTLD odcinają karboksylowy propeptyd prokolagenów 1, 2 i 3. Odcięcie C-propeptydów obniża około 1000 razy rozpuszczalność prokolagenu, co zapoczątkowuje samoistne składanie włókien kolagenowych. Innymi substratami BMP-1/mTLD są proooksydaza lizylova, łańcuch  $\gamma$  prolamininy, prokolagen VII, miostatyna, białko macierzy denty 1 (dentin matrix protein 1) i perlekan. Dzięki tak różnorodnym substratom białka BMP-1/mTLD są ważnymi regulatorami wytwarzania macierzy pozakomórkowej, oraz odpowiadają za wytwarzanie czynnika antyangiogenego ze składnika błony podstawnej – perlekanu. BMP-1/mTLD wpływają na tworzenie wzorca grzbieto-brzusznego, przez regulację aktywności kompleksu BMP2/4 z chordyną, rozwój tkanki mięśniowej i nerwowej, przez aktywację GDF8 i GDF11 oraz na wzrost i proliferację komórek, przez uwalnianie TGF- $\beta$ 1 z kompleksu latentnego.

Genetyczne podstawy ewolucji komórek *leiomyoma uteri* są również wciąż słabo poznane. Tylko w 40% guzów występują wykrywalne zaburzenia kariotypu.

### Słowa kluczowe:

*Leiomyoma uteri* • C-endopeptydaza prokolagenu • TGF- $\beta$  • macierz zewnątrzkomórkowa • kolagen

\* Praca powstała dzięki realizacji badań w ramach projektów finansowanych częściowo przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach NN-4-036/04 i MNiSW 3 P05D 037 23.



## Summary

Leiomyoma is a monoclonal benign tumor. It is often located in the muscle layer of the uterus in women of reproductive age. Its growth is accelerated by pregnancy and hormonal therapy. Its growth also depends on the concentration of sex hormones. Growth factors and cytokines may also participate in the formation of leiomyomas. The modulation of mitotic activity and abnormal extracellular matrix production are key elements of tumor growth. Elements of the TGF $\beta$  superfamily are crucial factors in the proliferation of neoplastic cells. TGF- $\beta$ 1 and - $\beta$ 3 stimulate the synthesis of various components of the extracellular matrix, but they also down-regulate the synthesis of proteinases which degrade the matrix, often leading to excessive overdeposition of connective tissue. Collagen types 1 and 3 are the main structural components of the extracellular matrix. The biosynthesis of collagens requires, among others, the action of procollagen C-endopeptidase, a protein of the BMP-1/mTLD subfamily. BMP-1/mTLD-like proteinases remove the carboxyl propeptides of procollagens 1, 2, and 3. Removal of the C-propeptides decreases the solubility of procollagens about 1000-fold to a concentration critical for their spontaneous self-assembly to collagen fibrils. Different substrates of BMP-1/mTLD are prollysin oxidase,  $\gamma$ 2 chain of prolaminin, procollagen type VII, miostatin, dentin matrix protein 1, and perlekan. Due to the activation of various substrates by BMP-1/mTLDs, they are important regulators of the production of the extracellular matrix and its quality as well as of antiangiogenic responses by producing a factor from the basal membrane compound called perlekan. The BMP-1/mTLDs influence the formation of dorsal ventral patterning in embryos by releasing BMP-2/4 from the inhibitory protein chordin. Another aspect is induction of the development of muscle and neural tissue by activation of GDF8 and GDF11 as well as the regulation of growth and cell proliferation by releasing TGF- $\beta$ 1 and - $\beta$ 3 from latent complexes. Another yet poorly understood aspect is the evolution of neoplastic cells based on other than molecular genetic mechanisms. The detectable karyotype anomalies in tumor cells constitute just 40%. Therefore in this review the possible roles of extracellular matrix compounds and regulatory factors in the pathology of leiomyoma are discussed.

**Key words:** *Leiomyoma uteri* • procollagen C-endopeptidase • TGF- $\beta$  • extranuclear matrix • collagen • PCPE

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_62/11570.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_62/11570.pdf)

**Word count:** 9022

**Tables:** 1

**Figures:** 1

**References:** 136

**Adres autora:** dr hab. n. med. Aleksander L. Sieroń, Katedra i Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki, Śląski Uniwersytet Medyczny, ul. Medyków 18, 40-752 Katowice; e-mail: alsieron@sum.edu.pl

**Wykaz skrótów:** **ADAMTS** – metaloproteinaza z domenami występującymi w dezintegrynach i motywami typu 1 w trombospondynie (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs); **bFGF** – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (basic fibroblast growth factor); **BMP-1** – białko morfogenetyczne kości 1 (bone morphogenetic protein 1); **BSP** – sialoproteina kości (bone sialoprotein); **CUB** – domena o sekwencji aminokwasowej występującej w komplemencie; zapłodnionym jaju jeżowca i białku morfogenetycznym kości 1 (complement-uegf-BMP1); **DEB** – ostra postać pęcherzowatego oddzielenia naskórka; **DMP1** – białko macierzy dentyiny (dentin matrix protein1); **DSPP** – sialofosfoproteina dentyiny (dentin sialophosphoprotein); **ECM** – macierz pozakomórkowa (extracellular matrix); **EGF** – czynnik wzrostu naskórka (epidermal growth factor); **EGF-like** – motyw o sekwencji aminokwasowej występującej w sekwencji naskórkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor-like); **ESR2** – gen receptora  $\beta$  estrogenu (estrogen receptor  $\beta$  gene); **FH** – gen hydratazy fumaranu; **GnRH** – gonadoliberyna (gonadotropin release hormone analog); **HBEGF** – naskórkowy czynnik wzrostu wiążący heparynę (heparin-binding epidermal growth factor); **hCG** – ludzka gonadotropina kosmówkowa (human chorionic gonadotropin); **HLRCC** – dziedziczna mięśniakowatość gładkokomórkowa z rakiem nerkowokomórkowym (hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma); **HMG** – białka związane z chromosomami; białka HMG (high mobility group); **HSPG** – główne proteoglikany błony podstawnej (basement membrane heparin

sulfate proteoglycans); **IGF** – insulinopodobny czynnik wzrostu (insulin-like growth factor); **IL-8** – interleukina 8; **LAP** – peptyd odpowiedzialny za latencję (latency associated peptide); **LG** – duża globularna domena (large globular); **LLC** – duże latentne kompleksy (large latent complex); **LOX** – oksydaza lizylowa (lysyl oxidase); **LTBP** – białko wiążące latentny TGF- $\beta$  (latent TGF- $\beta$ -binding protein); **MCP-1** – białko 1 chemotaktyczne monocytów (monocyte chemoattractant protein-1); **MCUL1** – zespół Reeda (multiple cutaneous and uterine leiomyomata); **MEPE** – fosfoproteina macierzy pozakomórkowej; **MMP** – metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (matrix metalloproteinases); **mTLD** – tolloid ssaczy (mammalian Tolloid); **mTLL** – tolloidopodobny (mammalian Tolloid-like); **OPN** – osteopontyna (osteopontin); **PCOLCE**; **PCPE** – wzmacniacz C-proteinazy prokolagenu (procollagen C-proteinase enhancer); **pCP** – C-endopeptydaza prokolagenu; **PCP** – C-proteinaza prokolagenu (procollagen C-proteinase); **PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor); **SIBLING** – niskocząsteczkowy ligand wiążący integrynę, N-związana glikoproteina (small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein); **SLRP** – małe bogate w leucynę proteoglikany (small-leucine rich proteoglycans); **SPC** – konwertazy prekursorów białek podobne do subtiliny (subtilin-like pro protein convertase); **TGF- $\beta$**  – transformujący czynnik wzrostowy beta (transforming growth factor  $\beta$ ); **TIMP** – tkankowo swoiste inhibitory metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (tissue specific inhibitors of matrix metalloproteinases); **TLD** – tolloid; **VEGF** – naczyńniowy-śródbłonkowy czynnik wzrostu (vascular endothelial growth factor).

### CHARAKTERYSTYKA GUZÓW TYPU *LEIOMYOMA*

Mięśniak gładkokomórkowy, zwany także *leiomyoma uteri*, jest niezłośliwym nowotworem złożonym z komórek mięśni gładkich z dodatkiem zrębu zbudowanego z włóknistej tkanki łącznej. Najczęściej jest umiejscowiony w błonie mięśniowej macicy. *Leiomyoma uteri* występuje u kobiet w wieku rozrodczym, a czynnikami mogącymi przyspieszać wzrost tego guza są ciąża i terapia hormonalna. Mięśniaki gładkokomórkowe macicy są najczęściej występującym nowotworem macicy, z szacunkową częstością występowania 20–30%, u kobiet powyżej 30 roku życia. Na podstawie liczby wykonywanych usunień macicy i wyników ich badań histopatologicznych oszacowano, że prawie 77% kobiet w wieku rozrodczym ma guza *leiomyoma*. Chociaż guz ten może być asymptotyczny, średnio 20–50% wywołuje takie zaburzenia jak: nadmierne krwawienia macicy, ból w miednicy, zaburzenia funkcji dróg moczowych, spontaniczne poronienia, przedwczesne porody i bezpłodność. Guzy tego typu są najczęstszym wskazaniem do histerektomii. Częstość i ostry przebieg tych objawów są bezpośrednio powiązane z liczbą guzów, ich rozmiarami i umiejscowieniem [20]. Średnio dwie trzecie kobiet ma wiele guzów o różnych rozmiarach. Guzy *leiomyoma* mogą występować w każdej części macicy i mogą być umieszczone śródściennie, podśluzówkowo i podsurowiczkowo [2]. W macicy może także występować kilkanaście ognisk guzowych.

Zaburzenia prowadzące do rozwoju niezłośliwych guzów macicy mogą być dziedziczne. Przemawiają za tym niektóre badania epidemiologiczne, które wykazują, że ryzyko zachorowania zmniejsza się wraz z liczbą porodów. Starano się także znaleźć związek ryzyka rozwoju tych mięśniaków z okresem wystąpienia pierwszej miesiączki i wiekiem osiągnięcia menopauzy. Inne czynniki brane pod uwagę, takie jak: otyłość, późny wiek reprodukcji i brak porodów również mają związek z podwyższonym ryzykiem rozwoju mięśniaków macicy. Inne badania z udziałem bliźniąt żeńskich wykazały, że ryzyko wystąpienia mięśniaka macicy jest znamienne statystycznie wyższe u bliźniąt

identycznych genetycznie niż u genetycznie różnych [9]. Przytoczone obserwacje wskazują więc, na potencjalne występowanie rodzinnego ryzyka rozwoju *leiomyoma*, szczególnie u spokrewnionych pierwszego stopnia z osobą dotkniętą tą chorobą i wydają się potwierdzać, że występuje dziedziczna podatność na nie [128].

Guzy gładkokomórkowe macicy to pospolite klonalne guzy zależne od obecności estrogenu, jednak swoiste zaburzenia genetyczne, które powodują ich rozwój nie zostały jeszcze do końca poznane. *Leiomyoma uteri* powstają prawdopodobnie w wyniku przekształcenia prawidłowych komórek mięśni gładkich błony mięśniowej macicy [119]. Wyniki badań cytogenetycznych wskazują, że pojedynczy guz jest skupiskiem komórek powstałych z jednej komórki błony mięśniowej macicy [77]. Podobnie jak w prawidłowym miometrium, komórki *leiomyoma* mają czynne receptory estrogenu i progesteronu, jest ich jednak wielokrotnie więcej [103]. Na uwagę zasługuje to, że w innych białkach obecnych w szlakach zależnych od estrogenów nie wykrywa się zmian w ich stężeniu i aktywności w porównaniu z kontrolą [21]. Natężenie wzrostu tych guzów zależy od stężenia hormonów płciowych. Wykazano bowiem znaczące zmniejszanie się ich rozmiaru, zarówno w menopauzie, jak i w pseudomenopauzie wywołanej stosowaniem analogu GnRH (gonadotropin release hormone analog) [111].

Wyniki badań ludzkich tkanek *in vitro*, których celem było wykazanie zależności wzrostu guza od obecności hormonów płciowych są jednak niejednoznaczne, a czasami wręcz przeczą przyjętym poglądom. Wskazują one na udział czynników pośredniczących, takich jak cytokiny i czynniki wzrostu, przez które hormony mogą wpływać na wzrost guza. Wiadomo, że estrogen i progesteron regulują ekspresję cytokin i czynników wzrostowych, które modyfikują aktywność innych czynników transkrypcyjnych. Rozregulowanie wytwarzania cytokin i czynników wzrostu może zwiększać częstość podziałów komórkowych, wzmacniać przerost komórek, gromadzenie macierzy pozakomórkowej (extracellular matrix – ECM) i/lub wszystkie te zja-



wiska mogą występować jednocześnie [111]. Modulacja aktywności mitotycznej, przerost komórek i nadmierne nagromadzenie ECM są jednak uznawane za główne czynniki wzrostu guzów *leiomyoma* [61].

Kawaguchi i wsp. [61] opisali wzmoczoną mitotyczną aktywność komórek w *leiomyoma* na początku fazy lutealnej (II faza), która utrzymywała się przez cały czas jej trwania, a następnie obniżała się podczas menstruacji. Ich obserwacje wskazują na znaczenie progesteronu w procesie proliferacji komórek w tych guzach. Komórki guzowe odpowiadają na działanie hormonów płciowych przez podwyższone wytwarzanie czynników pobudzających wzrost, utrzymując w ten sposób samostymulację proliferacji. Jedynymi zidentyfikowanymi dotychczas czynnikami wzrostu wytwarzanymi w lutealnej fazie *leiomyoma* w podwyższonym stężeniu są czynniki z rodziny transformujących czynników wzrostowych beta (transforming growth factors beta – TGF- $\beta$ ) [6], które podlegają dodatkowemu sprzężeniu zwrotnemu w hodowlach komórkowych *leiomyoma* w obecności progesteronu [23]. Dotyczy to zarówno guzów *leiomyoma*, jak i *myometrium*, gdzie obecność TGF- $\beta$ 3 już w małych stężeniach powoduje częstsze podziały komórek. Działanie to jednak zanika w bardzo dużych stężeniach tego czynnika [6]. W podobny sposób komórki reagują na TGF- $\beta$ 1 [112].

Jedną z oczywistych cech guzów *leiomyoma* jest podwyższona zawartość składników włókninowych tkanki łącznej i ECM. Na podstawie tej właściwości określa się opiswane guzy jako „fibroidy”. Nie tylko wydaje się oczywiste, że nadekspresja kolagenu, fibronektyny i glikozoaminoglikanów prowadzi do tworzenia guzów litych, ale także można przypuszczać, że nadmierne wytwarzanie ECM samo w sobie przyspiesza procesy metaboliczne prowadzące do wzrostu guza, przez wpływ na proliferację komórek i ich różnicowanie, a także przez magazynowanie w ECM biologicznie aktywnych czynników wzrostu i cytokin [111].

Wykazano, że ekspresja niektórych cytokin jest zaburzona w guzach *leiomyoma*. Matrycowe RNA, takich czynników jak: czynnik wzrostu naskórka (epidermal growth factor – EGF), naskórkowy czynnik wzrostu wiążący heparynę (heparin-binding epidermal growth factor – HBEGF), insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (insulin-like growth factor-1 – IGF-1), IGF-2 (insulin-like growth factor-2), płytkopochodny czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor – PDGF) i peptyd podobny do hormonu przytarczyc parathormonu (parathyroid hormone related peptide – PTHrP) są wykrywane w guzach w podwyższonej liczbie kopii. Stężenie mRNA tych białek jest zależne od regulacji hormonalnej, a jego maksymalna wartość występuje w fazie folikularnej (I faza) [111].

Białko 1 chemotaktyczne monocytów (monocyte chemoattractant protein-1 – MCP-1) jest polipeptydem, który działa jako silny chemoatraktant monocytów i ma właściwości antyguzowe w różnych tkankach. W guzach *leiomyoma* natężenie jego ekspresji ulega znacznemu obniżeniu w porównaniu z błoną mięśniową (*myometrium*), przy czym jego maksimum, w tkance prawidłowej, jest wykrywane w fazie lutealnej (II faza) cyklu. Spadek natężenia ekspresji MCP-1 jest wykrywany przy obecności estradiolu [111]. Matrycowe RNA kodujące: endotelinę 1, zasadowy czyn-

nik wzrostu fibroblastów (basic fibroblast growth factor – bFGF), ludzką gonadotropinę kosmówkową (human chorionic gonadotropin – hCG), a także interleukinę 8 (IL-8) również są wykrywane w podwyższonej liczbie kopii w guzach *leiomyoma*. Dotychczas nie stwierdzono jednak zależności natężenia ekspresji tych cytokin od stężenia hormonów płciowych [111].

Najintensywniej badanym czynnikiem wzrostu w macierzy pozakomórkowej jest transformujący czynnik wzrostu beta (transforming growth factor  $\beta$  – TGF- $\beta$ ), który jest aktywny jako homodimer. Monomer tego polipeptydu występuje w trzech izoformach (TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3) kodowanych przez oddzielne geny i jest zaliczany do nadrodziny czynników wzrostu TGF. Niektórzy badacze uważają, że jest on prototypem wieloczynnikowych cytokin aktywnych w modulowaniu rozwoju komórek. Ich aktywność reguluje proliferację komórek, zarówno blokując jak i pobudzając ją. TGF- $\beta$  jest również znanym stymulatorem syntezy wielu składników macierzy pozakomórkowej [111]. Poza składnikami ECM, TGF- $\beta$  *in vitro* reguluje ekspresję własną, wytwarzanie metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (matrix metalloproteinase – MMP), oraz ich tkankowo swoistych inhibitorów (tissue specific inhibitor of matrix metalloproteinase – TIMP). Aktywność TGF- $\beta$  wiąże się ze wzrostem *leiomyoma* i jest ona obecnie uważana za jedną z głównych charakterystycznych cech tego nowotworu [29]. Podwyższoną ekspresję czynników z nadrodziny TGF- $\beta$  i ich receptorów w błonie mięśniowej oraz *leiomyoma* po raz pierwszy wykazano w 1994 roku [8,24]. W cytowanych badaniach wykazano także, że ekspresja TGF- $\beta$  zależy od fazy cyklu miesięcznego kobiety. Natężenie ekspresji czynnika wzrostu znacząco wzrastało osiągając maksimum do połowy fazy lutealnej. W badaniach *in vitro* potwierdzono taką regulację hormonalną, w której progesteron i estradiol pobudzają syntezę TGF- $\beta$ 1 [23]. W tych samych badaniach uzyskano wyniki wskazujące na to, że guzy *leiomyoma* kobiet, będących w fazie folikularnej i lutealnej, wydzielają znacznie więcej aktywnego TGF- $\beta$ 1 niż u kobiet poddanych działaniu analogu GnRH [7]. Ekspresja innej izoformy tego czynnika, a mianowicie TGF- $\beta$ 3 była 3,5 razy większa w tkankach guzowych niż w prawidłowej błonie mięśniowej, co wskazuje na jego ważną rolę w patogenezie *leiomyoma* [8]. Wyniki najnowszych badań opublikowane przez Luo i wsp. [80] wskazują wręcz na to, że ścieżka sygnałowa TGF- $\beta$  jest głównym autokrynnym/parakrynnym regulatorem włóknienia guzów *leiomyoma*.

Ścieżka sygnałowa z udziałem TGF- $\beta$  uczestniczy w tworzeniu guzów, zarówno jako inhibitor, jak i stymulator wzrostu guzów. Dowiedzono, że TGF- $\beta$  działa jako czynnik supresorowy we wczesnej patogenezie uszkodzeń nabłonka, podczas gdy w późniejszych stadiach rozwoju choroby jest czynnikiem promującym przekształcenie nabłonka w mezenterium. Czynniki tej nadrodziny pośredniczą także w pobudzaniu przerzutowania nowotworów. Ponadto, TGF- $\beta$  oddziałuje na mikrośrodowisko guza jako czynniki immunosupresyjne i pobudzające angiogenezę [66].

#### **BIOLOGIA I PATOLOGIA MACIERZY POZAKOMÓRKOWEJ**

Prawidłowa tkanka łączna podlega ciągłej przebudowie, która wymaga zarówno rozkładu starych, jak i syntezy no-



wych składników ECM. Akumulacja macierzy pozakomórkowej jest najbardziej charakterystyczną cechą wszystkich schorzeń zwłóknieniowych, dlatego wydaje się, że tworzenie *leiomyoma*, również polega na zwiększonym odkładaniu składników ECM, przy jednoczesnym spowolnieniu tempa ich rozkładu. Metaloproteiny macierzy to enzymy, potrzebne do degradacji składników ECM. Degradacja zrębu macierzy *in vivo* zależy od równowagi między aktywnością tych enzymów i stężeniem ich swoistych tkankowo inhibitorów. Białka TIMP są ponadto związane z regulacją wzrostu komórek i wykazują właściwości typu czynników wzrostu w niektórych typach komórek [50]. W obecności TGF- $\beta$ 1 wykazano w tkankach podwyższone stężenia TIMP-1 i obniżone stężenia MMP-1 i MMP-3, co może tłumaczyć słabszą degradację składników ECM [81]. Można by się spodziewać, że mRNA kodujące MMP w guzach *leiomyoma* będą występowały w mniejszej liczbie kopii, jednakże odkrycie, że ekspresja np. MMP-11 jest bardziej natężona, wskazuje na to, że proteiny z rodziny MMP pełnią także inne, prawdopodobnie unikalne role, w guzach typu *leiomyoma*. Jednak mRNA kodujące proteiny MMP-1, -2, -3 i -9 były obecne w guzach w mniejszej liczbie kopii w porównaniu do niezmięnionej błony mięśniowej macicy [28]. Stężenia mRNA wymienionych MMP były maksymalne podczas fazy lutealnej cyklu miesięcznego [28]. Geny kodujące MMP ulegają ekspresji w cyklu miesięcznym przy małym stężeniu progesteronu, tzn. podczas fazy folikularnej i menstruacji. W fazie lutealnej, gdy stężenie progesteronu jest duże, natężenie ekspresji większości proteinaz MMP spada. Ludzkie komórki śródbłonkowe (endometrialne) hodowane w obecności progesteronu charakteryzowała podwyższona liczba kopii TGF- $\beta$ , który jak wiadomo hamuje syntezę MMP-3 i MMP-7. Obie te metaloproteiny pełnią ważną funkcję w degradacji fibronektyny. W guzach *leiomyoma*, występuje podobna zależność podwyższonej ekspresji TGF- $\beta$ 3 pod wpływem progesteronu, co z kolei wpływa na wzrost stężenia fibronektyny [6]. Wykazano, że w obecności TGF- $\beta$  w tkankach pojawia się również ekspresja TIMP. Jedną z funkcji tkankowych inhibitorów metaloproteinaz jest blokowanie aktywności enzymatycznej proteinaz z rodziny MMP, przez co spowalniają one degradację fibronektyny [111]. Procesy regulujące aktywność MMP są jednak bardziej złożone, a udział w nich TIMP-ów jest tylko jednym, ale nie jedynym mechanizmem nadzorującym ich aktywność. Podawanie do guzów *leiomyoma* przeciwciała anti-TGF- $\beta$ , a także 24-godzinna hodowla komórek myometrium w obecności tego przeciwciała, obniżało stężenia mRNA kolagenu I i III, co wskazuje na ważną funkcję endogennego TGF- $\beta$  w regulacji wytwarzania kolagenów włóknienkowych [68]. Po zablokowaniu ścieżki sygnałowej zależnej od TGF- $\beta$  w komórkach pochodzących z guzów *leiomyoma* stwierdzono znaczącą redukcję, zarówno liczby komórek, jak i ich proliferacji [66].

Ignotz i Massague [55] opisali, że TGF- $\beta$  pobudza ekspresję fibronektyny i kolagenu, a także pełni ważną rolę w ich wbudowywaniu do ECM. Dalsze badania nad innymi funkcjami TGF- $\beta$  w biologii macierzy pozakomórkowej ujawniły, że zmiany jej składu w związku z zaburzeniami w ekspresji fibronektyny, kolagenu i innych czynników macierzy znacząco wpływają na proliferację komórek, ich różnicowanie i transformację nowotworową [49,54,124]. Poza utrzymaniem kształtu komórek, ich proliferacji i różnicowaniu,

macierz pełni też dynamiczną rolę magazynu biologicznie aktywnych cytokin i licznych czynników wzrostowych. Składniki macierzy pozakomórkowej, takie jak kolageny, fibronektyna i proteoglikany służą ograniczeniu „odpływu” cytokin i czynników wzrostu od komórek guzowych przez wiązanie ich mocniej do siebie i przeciwdziałanie ich przemieszczaniu na dalsze odległości. Jednym z przykładów na to jest wiązanie w ECM latentnego TGF- $\beta$  po jego wydzieleniu z komórek. Dopiero uwolnienie TGF- $\beta$  z połączenia z macierzą umożliwia jego łączenie z receptorami. Uwalnianie TGF- $\beta$  z kompleksu ze składnikami macierzy pozakomórkowej wymaga ich proteolizy przez proteiny z rodziny MMP oraz C-endopeptydazę prokolagenu (procollagen C-proteinase – PCP). W podobny sposób są uwalniane inne czynniki wzrostu związane z macierzą pozakomórkową [75].

Głównym składnikiem macierzy, ważnym w pełnieniu funkcji magazynu czynników wzrostu, są proteoglikany. Siarczan heparyny jest podstawowym proteoglikanem wiążącym, takie czynniki wzrostu jak: bFGF, TGF- $\beta$  i PDGF, zarówno w prawidłowej błonie mięśniowej macicy, jak i w guzach *leiomyoma* [129]. Lokalne zmiany aktywności czynników, które kontrolują proliferację komórek i przebudowę ECM, mogą być wywołane przez ich nagłe uwolnienie z macierzy z jednoczesną aktywacją proteolityczną. Dlatego właśnie proteoglikany mogą pełnić ważną rolę w tumorogenezie [111].

Liczba kopii mRNA kodujących kolageny typów I i III oraz fibronektynę wykazuje w guzach zmienność zależną od fazy cyklu miesięcznego i jest wyższa w fazie proliferacyjnej (folikularnej) [6,117]. Glikoaminoglikany i związane z nimi białka, proteoglikany także ulegają bardziej natężonej ekspresji w guzach *leiomyoma* [129]. Badania natężenia ekspresji genów za pomocą mikromacierzy cDNA ujawniły, że głównymi genami, których ekspresja w guzach *leiomyoma* jest rozregulowana są geny kodujące białka związane z tworzeniem macierzy pozakomórkowej, takie jak: kolageny, proteoglikany i elastyna oraz geny, których produkty regulują syntezę i budowę tej macierzy, np.: TGF- $\beta$ 1 i - $\beta$ 3 [74]. Nadmierne wytwarzanie składników macierzy pozakomórkowej jest cechą charakterystyczną guzów *leiomyoma* i wskazuje na zaburzenie równowagi pomiędzy syntezą i rozkładem składników ECM. Zwłaszcza wzrost obecności dużych proteoglikanów, takich jak wersikan (versican) jest powiązany ze zwiększoną aktywnością ścieżki sygnałowej z udziałem TGF- $\beta$  [74]. Wykazano, że kolageny w guzach *leiomyoma* nie tylko występują w zwiększonym stężeniu, ale także są nieprawidłowo uporządkowane. Zaburzona jest orientacja i długość włókien kolagenowych [74]. Budowa źle poskładanych struktur włóknienkowych kolagenu może, przynajmniej w części, wynikać z zaburzenia regulacji ekspresji genów kodujących czynniki odpowiedzialne za prawidłową syntezę i potranslacyjną obróbkę prokolagenu, takie jak np. C-endopeptydaza prokolagenu. Ponadto, nieprawidłowa budowa ECM może być powodem, dla którego składniki macierzy w guzach *leiomyoma* nie ulegają degradacji, tak jak się to dzieje w prawidłowej macierzy [74]. Natężenie ekspresji białka wiążącego kolagen, dermatopontyny (dermatopontin) jest znacząco mniejsze (około 10 razy) w guzach w porównaniu z prawidłową błoną mięśniową macicy, bez względu na wielkość guza, jego położenie, wiek i rasę



pacjentek [21]. Redukcja stężenia dermatopontyny zależy od wzrostu natężenia ekspresji TGF- $\beta$ 3 [21]. Te obserwacje wskazują, że rozrost *leiomyoma* jest związany z zaburzeniem regulacji ekspresji genów kodujących białka macierzy zewnątrzkomórkowej. Natężenie ekspresji genów PCOLCE (procollagen C-proteinase enhancer 2) i TIMP3 było bowiem również obniżone prawie 4-krotnie [9].

## GENETYKA GUZÓW LEIOMYOMA

Część guzów *leiomyoma uteri* (około 40%) wykazuje w komórkach nieprawidłowości kariotypu, polegające na nielosowych i swoistych dla guzów aberracjach chromosomowych [79]. Komórki z nieprawidłowym kariotypem w guzach, w porównaniu do guzów z komórkami bez aberracji chromosomowych cechuje wyższy indeks mitotyczny i mniejsze stężenie DNA w komórkach. Nie reagują one również na terapię z użyciem agonistów GnRH [79]. Pozostałe 60% guzów *leiomyoma* ma komórki z prawidłową liczbą i budową chromosomów, co wskazuje, że genetyczne zaburzenia są w ich komórkach najprawdopodobniej submikroskopowe. Ta obserwacja wydaje się tłumaczyć hipotezę, że aberracje strukturalne w komórkach nowotworowych są zmianą drugorzędową [79]. Najczęstszymi aberracjami chromosomowymi są: translokacja t(12;14)(q14-q15;q23-q24), rearanżacja 6p21 i delecja del(7)(q22q32). Rzadziej stwierdza się rearanżacje 1p36, 10q22, 13q21-22, del(X)(q3) oraz trisomie chromosomu 12. Różnorodność aberracji wskazuje na wielorakość mechanizmów genetycznych związanych z tworzeniem guzów, takich jak *leiomyoma*, co może również tłumaczyć ich znaczne rozpowszechnienie [79].

Histologicznie w komórkach 12% guzów podśluzówkowych występują aberracje chromosomowe. W komórkach podsurowiczkowych zaburzenia chromosomowe dotyczą 29% takich guzów, a w 35% guzów śródściennych stwierdza się komórki z zaburzeniami kariotypu [79].

Badania histopatologiczne i cytogenetyczne ujawniły bezpośredni związek między rozmiarem guza i typem zaburzenia kariotypu w komórkach guzów. *Leiomyoma* z delecją chromosomu 7, o przeciętnej średnicy guza 5 cm, są wielkością zbliżone do guzów o komórkach kariotypowo prawidłowych (średnio 5,4 cm), ale mniejsze niż *leiomyoma* z translokacją (12;14) (średnio 8,5 cm). [79] Wiele mozaikowych guzów, w większości z delecją w chromosomie 7 [del7(q22q23)], jest mniejsza niż guzy z komórkami o niezmiennym kariotypie, co wskazuje, że utrata materiału genetycznego z chromosomu 7 może spowalniać rozrost guza. Należy jednak zauważyć, że większe guzy częściej zawierają komórki o nieprawidłowym kariotypie niż mniejsze guzy. Dotychczas nie wykazano istotnej zależności między zaburzeniami cytogenetycznymi i wiekiem pacjentek lub liczbą porodów [79].

Genem, w którym mutacja jest prawdopodobną przyczyną zaburzeń związanych z translokacją w chromosomie 12 – t(12;14)(q14-q15;q23-q24) jest *HMG2* (high-mobility group A2), w którym znajduje się gen czynnika zaliczane do heterogennej rodziny niehistonowych białek jądrowych wiążących DNA, HMG. Ekspresja tego genu nie jest obserwowana w prawidłowej tkance. W komórkach guzów z translokacją w chromosomie 12 obserwuje się bardziej natężoną ekspresję genu *HMG2* w porównaniu do

komórek guzowych bez omawianej zmiany [79]. Innymi potencjalnymi genami, których mutacje mogą mieć związek z rearanżacją chromosomu 12 są *ESR2* – receptor  $\beta$  estrogenu (estrogen receptor  $\beta$  gene) i *RAD51L1*. Jednakże *ESR2* nie wykazuje różnic w natężeniu ekspresji w tkance prawidłowej i guzie, co wydaje się wskazywać na brak bezpośredniego jego udziału w patogenezie *leiomyoma*. *RAD51L1* jest zaangażowany w naprawę rekombinacyjną DNA, proliferację komórek, postęp cyklu komórkowego oraz apoptozę, co oznacza jego prawdopodobny udział w tworzeniu guzów *leiomyoma*, ale jego faktyczna rola nie jest jeszcze w pełni poznana [79].

Rearanżacja chromosomu 6 w obrębie prążka p21 występuje w komórkach mniej niż 10% kariotypowo prawidłowych guzów. W prążku tym wykryto inny gen z rodziny HMG, a mianowicie *HMG1*, który także wykazuje swoisty dla guzów *leiomyoma* wzór ekspresji [79].

Chociaż geny *HMG2* i *HMG1* są podobne strukturalnie i funkcjonalnie, i obydwa wydają się pełnić jakąś rolę w rozwoju *leiomyoma*, różnią się one jednak w natężeniu ekspresji, funkcji i pod względem obecności czynników transkrypcyjnych. Największą liczbę kopii mRNA obu tych genów wykryto w guzach oraz w prawidłowych tkankach zarodków. Białka te wiążą DNA i prawdopodobnie pełnią rolę w stabilizacji genomu. Wprawdzie wykazano, że białka te pełnią ważną rolę w patogenezie *leiomyoma*, to ich dokładna funkcja jest jeszcze słabo poznana [102]. Nadal jest niepewne czy wiązanie czynników transkrypcyjnych z rodziny HMG służy wzbudzeniu ekspresji genów czy też wiązanie to zapobiega aktywacji nieznanymi bliżej genów supresorowych [79].

W komórkach 17% kariotypowo nieprawidłowych guzów *leiomyoma* wykryto delecję chromosomu 7-del(7)(q22q23), która zazwyczaj występuje w mozaikowych guzach o kariotypie komórek prawidłowych 46,XX [133]. Chociaż del(7)(q22q23) oraz translokacja 7q22q32 występowały również w innych mezenchymalnych guzach (liposomalne i endometrialne polipy) aberracje te najczęściej znajdowano w guzach *leiomyoma* [106]. Translokacje w obrębie 7q22 rzadko występują w *leiomyoma*, w porównaniu do delecji, chociaż ich występowanie nie tylko potwierdza związek tego regionu z patogenezą *leiomyoma*, ale także służy jako wartościowe narzędzie badawcze w wykrywaniu genów predyspozycji na chromosomie 7 [106]. Na uwagę zasługuje również to, że guzy z komórkami z delecją del(7)(q22q32) są mniejsze niż guzy z translokacją t(12;14), co może być spowodowane przez gen supresorowy guza, obecny w locus 7q22 i związany z regulacją proliferacji komórek guza. Ponadto, guzy z tą delecją w hodowlach komórkowych często tracą komórki z zaburzeniami chromosomowymi, co wskazuje na ich niestabilność w guzie i co jeszcze raz wskazuje na prawdopodobny udział jakiegoś genu supresorowego [79]. Delecja del(7)(q22q32) może występować pojedynczo lub wraz z translokacją t(12;14). Guzy z oboma zaburzeniami są stabilne w hodowlach komórkowych i zachodzi w nich ekspresja genu *HMG2*. Wyniki te wskazują, że geny związane z loci znajdujących się w utraconym odcinku 7q22g32 mogą nie być niezbędne w patogenezie *leiomyoma*, oraz że delecja ta może być wczesnym zdarzeniem genetycznym w ewolucji guza [79]. Geny występujące w odcinku 7q22, któ-

re są potencjalnie związane z patogenezą *leiomyoma* to: czynnik transkrypcyjny *CUTLI*, czynnik replikacji DNA – *ORC5L*, *PAII* (czynnik odpowiedzialnych za homeostazę i migrację komórek mięśni gładkich i adipocytów), *PMS218* (czynnik uczestniczący w naprawie uszkodzeń DNA typu mismatch), *COLIA2* (kodujący łańcuch alfa 2 kolagenu typu I) i *PCOLCE1* (regulujący przekształcanie prokolagenów włókiennych do monomerów kolagenowych), a także *DLX5* i *DLX6* (uczestniczące w regulacji różnych procesów rozwojowych). Chociaż guzy z delecją chromosomu 7 wykazują utratę heterozygotyczności lub zredukowaną ekspresję niektórych z wymienionych genów, a mianowicie: *CUTLI*, *ORC5L*, *PAII* i *PCOLCE*, dotychczas nie wykryto bezpośrednich konsekwencji delecji tych genów [79].

Rearanżacja chromosomu 1 często jest spowodowana tworzeniem kolistego chromosomu: r(1)(p34q32). Obserwowano jednak także translokacje t(1;6)(q23;p21) i t(1;2)(p36;p24). Kolisty chromosomy są zazwyczaj znajdowane tylko w kombinacji z innymi cytogenetycznymi aberracjami, chociaż mogą być to drugorzędowe zmiany w guzach z komórkami o nieprawidłowych kariotypach. Na szczególną uwagę zasługuje to, że gen jednego z białek rodziny HMG, *HMG17*, jest umiejscowiony na krótkim ramieniu chromosomu 1 (p35), który ulega delecji w guzach z kolistym chromosomem 1. Wskazuje to, że natężona ekspresja *HMG17* nie jest potrzebna w rozwoju guzów *leiomyoma*, prawdopodobnie jest ważna podczas formowania się guza przez bliżej nieznaną alternatywną mechanizm [97]. Wyniki badań nad rearanżacją chromosomu 1, dotyczącą prążków q42-q44 ujawniły w tym odcinku obecność genu kodującego hydratyzę fumaranu (fumarate hydratase – FH), którego mutacje są powiązane z patogenezą zarówno w mięśniakowatości gładkokomórkowej, w tym z dziedzicznym rakiem nerkowokomórkowym (hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma – HLRCC) jak i zespołem Reeda (multiple cutaneous and uterine leiomyomata – MCUL1) [44]. Gen hydratazy fumaranu jest genem kodującym jeden z enzymów cyklu Krebsa, który katalizuje przekształcenie fumaranu w jabłczan. Wykryto wiele różnych mutacji genu FH, ale wszystkie są przyczyną braku lub syntezy krótszego lub niefunkcjonalnego białka [118]. U nosicieli zmutowanego genu FH zachodzi podwyższone ryzyko zachorowania na raka brodawkowatego nerek (papillary renal cell carcinoma) na postać raka nerkowokomórkowego o bardzo agresywnym przebiegu. Ponadto, u kobiet nosicielek mutacji występuje zwiększone ryzyko wystąpienia mięsaków macicy i częściej zapadają one na nowotwory w okresie pomenopauzalnym [118]. Wydaje się także, że mutacje genu FH występują u niektórych kobiet z *leiomyomata* bezobjawowymi [118].

#### CZYNNIKI KONTROLUJĄCE JAKOŚĆ MACIERZY POZAKOMÓRKOWEJ

O jakości macierzy pozakomórkowej decyduje jej budowa zależna od prawidłowego składu, a więc stosunków jakościowych budujących ją monomerów. Jakość monomerów jest kontrolowana już podczas syntezy w komórce, przez odpowiednie modyfikacje potranslacyjne, później w przestrzeni pozakomórkowej przez odpowiednie aktywatory i modyfikatory tych monomerów. Jednym z intensywnie badanych czynników kontrolujących macierz pozakomórkową jest C-endopeptydaza prokolagenu (EC 3.4.24.19). Jest to

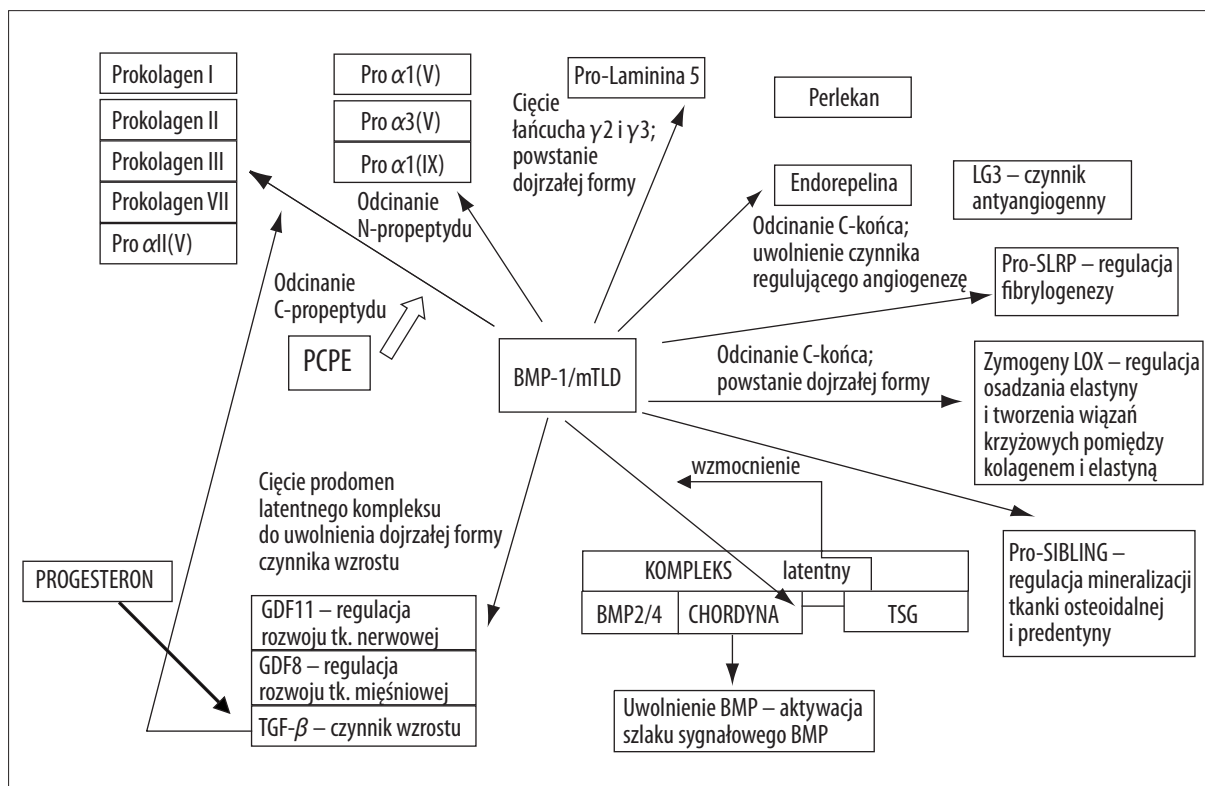
cynkozależna metaloproteinaza zaliczana do rodziny astacyn (M12A) z podklanu metcynkin [45]. Proteinazy tej rodziny są syntetyzowane w tkankach organizmów, zarówno rozwijających się, jak i dojrzałych organizmach, od stułbi do człowieka. Ich funkcje są różnorodne od trawienia polipeptydów poczynając na obróbce białek macierzy i aktywacji czynników wzrostowych kończąc. C-endopeptydaza prokolagenu, znana jest także jako C-proteinaza prokolagenu (PCP – procollagen C-proteinase), ze względu na pierwotny związek jej aktywności z obróbką prokolagenu, polegającą na odcinaniu polipeptydu z karboksylowego końca prokolagenu typu I [52]. Inną nazwą tej metaloproteinazy jest BMP-1, ze względu na historię odkrycia białka w związku z badaniami nad wzbudzeniem tworzenia tkanek kostnych [131]. We frakcji zdeminalizowanych kości, które po oczyszczeniu wstrzyknięto do miękkich tkanek gryzoni uzyskano pozatankowe śródczęstne tworzenie kości [131]. Szczegółowa analiza biochemiczna i molekularna kościotwórczych wyciągów doprowadziła do oczyszczenia cDNA kodującego czynnik, który nazwano białkiem morfogenetycznym kości 1 (bone morphogenetic protein 1 – BMP-1). BMP-1 różniło się od innych BMP, zaliczanych do nadrodziny czynników wzrostowych TGF- $\beta$ , odmienną strukturą domenową, wśród których była konserwatywna ewolucyjnie domena proteazowa, taka jak w innych poznanych białkach z rodziny astacyn [22]. Prockop i wsp. [76] stwierdzili, że BMP-1 jest tym samym białkiem, co C-proteinaza prokolagenu. Gen *bmp1* koduje także matrycę dłuższej proteinazy powstającą przez alternatywne składanie mRNA. Z powodu jego podobieństwa strukturalnego do białka wykrytego u *Drosophila*, zwanego TLD (Tolloid), dłuższy produkt genu *bmp1* nazwano mTLD (mammalian Tolloid) [123]. Białka BMP-1 i mTLD są obecnie zaliczane do niewielkiej podgrupy zwanej metaloproteinazy BMP1/TLD-podobne, które występują u wielu gatunków kręgowców. Poza wymienionymi dwoma białkami, do grupy tej należą też dwie genetycznie różne proteinazy nazwane mTLL1 [121] i mTLL2 [107] (mammalian Tolloid-like 1 i 2).

C-endopeptydaza prokolagenu składa się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, którego aminokwasy tworzą kilka domen [76]. BMP-1 jest syntetyzowany jako preproenzym zbudowany z 730 aminokwasów, którego prodomena jest usuwana proteolitycznie przez konwertazy proprotein podobne do subtyliny (subtilin-like proprotein convertases – SPCs) [73]. Za prodomeną występuje domena proteazowa (podobna do domeny astacyn – astacin-like) długości 201 aminokwasów, za nią dwie domeny CUB (complement-uegf-BMP1) [16] odpowiedzialne za oddziaływanie typu białko-białko. Następnym jest motyw wiążący wapń o składzie i kolejności aminokwasów występujących w naskórkowym czynniku wzrostu (epidermal growth factor-like – EGF). Ostatnią jest trzecia domena CUB [63]. W mTLD zbudowanym z 987 aminokwasów, za trzecią domeną CUB występuje dodatkowy motyw EGF oraz dwie domeny CUB4 i CUB5. Na końcu karboksylowym oba białka mają krótkie niehomologiczne sekwencje aminokwasowe.

Prodomena nie jest konieczna ani do poprawnej biosyntezy, ani do wydzielania czy aktywności enzymatycznej białek BMP-1/mTLD [109]. Funkcją prodomeny wydaje się jedynie utrzymanie białka w stanie latentnym z bardzo małą, prawie niewykrywalną aktywnością enzyma-







Ryc. 1. Schemat oddziaływań i wzbudzenia aktywności przez białka podrodziny BMP-1/mTLD; skróty objaśniono w tekście

tyczną [109]. Usunięcie prodomeny przez SPCs zachodzi wewnątrz sieci transaparatu Golgiego [73], co może wskazywać, że białka BMP-1/mTLD zaczynają działać jeszcze przed wydzielaniem na zewnątrz komórki. Mogą być też wydzielane do środowiska zewnątrzkomórkowego, jako zymogen. Bardzo możliwe, że prodomena pełni funkcję podczas oddziaływań zewnątrzkomórkowych z innymi składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej [37].

Zarówno BMP-1, jak i mTLD są N-glikozylowane w prodomenie, domenie proteazowej, CUB1, CUB3 i C-końcowej części białka. N-glikozylacja jest ważna w procesie wydzielania i stabilności białka. Białka pozbawione N-glikozylacji w CUB domenach są termicznie niestabilne i nie są wydzielane do macierzy pozakomórkowej, lecz są kierowane do proteasomu celem degradacji. Ponadto N-glikozylacja pełni ważną rolę w aktywności enzymu jako C-proteinyzy prokolagenu, albo przez bezpośrednie oddziaływanie enzym-substrat, albo pośrednio w oddziaływaniach domena-domena [35].

CUB domeny oddziałują między sobą i z substratami za pośrednictwem oddziaływań białko-białko. Wiele substratów białek BMP-1/mTLD jest związanych z procesami rozwojowymi [16].

Domena CUB1 jest konieczna do wydzielenia białka z komórki, a domena CUB2 podtrzymuje aktywność C-proteolityczną [47]. Najnowsze badania grupy Greenspana i wsp. [40] wykazały, że w przeciwieństwie do poprzednich doniesień Kadlera i wsp. [47] obecność domeny CUB1 nie jest jednak wymagana do wydzielenia BMP-1/mTLD, oraz że białka pozbawione domen CUB i EGF

zachowują aktywność pCP i są w pełni aktywne w czasie biosyntezy probiglikanu. Domena CUB1 nie jest konieczna do wydzielania białka, chociaż znacznie wzmacnia tę zdolność komórek, a CUB2 nie jest konieczna do aktywności C-proteolitycznej (pCP) jako, że izolowana domena proteazowa również wykazuje taką aktywność [40]. Warto zauważyć, że domena proteazowa białka tnie prokolagen I tylko w określonym miejscu w obszarze C-telepeptydu, co wskazuje, że za swoistość cięcia substratu jest odpowiedzialna także domena proteazowa; w przeciwieństwie do innych doniesień, w których podaje się, że za swoistość wiązania proteinyzy do określonych substratów odpowiadają tylko domeny CUB i EGF [40]. Ponadto domena CUB3 białka BMP-1/mTLD jest odpowiedzialna za wiązanie z białkiem aktywującym PCPE1 [40]. Funkcje pozostałych domen CUB nie zostały jeszcze do końca poznane, mogą one pełnić rolę w oddziaływaniu z wieloma substratami i/lub kierowanie proteinyzy do swoistych przedziałów przestrzeni pozakomórkowej przez wiązanie do składników macierzy pozakomórkowej lub powierzchni komórki [37]. Wariant alternatywnego składania BMP-1 uwalnia BMP2/BMP4 z latentnych kompleksów z chordyną przez przetwarzanie *in vitro* i *in vivo* pozakomórkowego antagonisty, chordyny (ryc. 1). Aktywności tej nie wykazuje mTLD [107]. W enzymie BMP-1 ważnym determinantem działalności chordyno-litycznej jest domena CUB1, która występuje także w wariancie mTLD. Aktywność chordyno-lityczna wariantu mTLD jest blokowana przez motyw EGF2, który także hamuje jego aktywność jako C-proteinyzy prokolagenu [34]. Z czterech białek BMP1/TLD-podobnych, wariant BMP-1 ma największą aktywność odcinania karboksylowego polipeptydu prokolagenu [107].



Tabela 1. Czasowa i tkankowościowa ekspresja wariantów alternatywnego składania produktu genu BMP-1

Wariant	Czas i miejsca występowania		
	Zarodek	Płód	Dorosły
BMP-1	mezenchyma	wszystkie tkanki w tym mineralizujące kości	serce, płuca, mięśnie szkieletowe, wątroba, nerki, łożysko
mTld	mezenchyma, a później cały zarodek, głównie brzuszna część płytki nerwowej	wszystkie tkanki w tym mineralizujące kości	mózg, serce, płuca, mięśnie szkieletowe, wątroba, nerki, łożysko
BMP-1/His (tylko mRNA)	łożysko	rozwijające się kości	nie wykryto

Aktywność enzymu C-endopeptydazy prokolagenu jest zależna – poza jonami cynku – od obecności jonów wapnia. Za wiązanie  $Ca^{2+}$  odpowiada motyw EGF [63] oraz jedna z domen CUB lub/i domena proteazowa [34]. Wykryto bowiem, że izolowana domena proteazowa BMP-1/mTLD jest także zależna od jonów wapnia [40]. Ponadto, motyw EGF wariantu mTLD pomaga tworzyć czwartorzędową strukturę białka, która wyklucza w różnym stopniu niektóre substraty z miejsca aktywnego enzymu [34] oraz tworzy sztywną konfigurację, która w dużym stopniu odpowiada za strukturalne i funkcjonalne właściwości białka. Udowodniono, że za wiązanie enzymu do prokolagenu I odpowiadają motywy EGF, a zwłaszcza kompleks EGF2-CUB4, który występuje tylko w wariantach mTLD, co pozwala wyjaśnić różnice w aktywności występujące między dwoma wariantami alternatywnego składania genu *bmp1* [51]. Dłuższy wariant wiąże się mocniej z prokolagenem I oraz z innymi komponentami macierzy zewnątrzkomórkowej niż wariant BMP-1 [51]. Na podstawie przytoczonych faktów paradoksem wydaje się więc, że białko BMP-1 jest bardziej efektywną C-proteinazą prokolagenu od mTLD, a także to, że enzym mTLD nie jest zdolny do cięcia niektórych substratów wariantu BMP-1 (takich jak chordyna). Możliwe, że powodem takiego paradoksalnego zachowania wariantów genu *bmp1* jest specjalna struktura typu spinki do włosów dłuższego wariantu, która odgina motyw CUB4-CUB5 w sąsiedztwo domeny katalitycznej i w ten sposób może przeciwdziałać dostępowi domeny proteazowej do określonych substratów. Struktura taka jest włączana przez motywy EGF, a zwłaszcza EGF2, co także wpływa na sztywność całej konformacji wariantu mTLD [34].

#### ZNACZENIE PRODUKTÓW GENU BMP-1 DLA BIOLOGII MACIERZY POZAKOMÓRKOWEJ

Warianty alternatywnego składania charakteryzują się czasową i tkankową swoistością syntezy (tab. 1). mRNA produktów genu *bmp1* występują w dojrzałych tkankach myszy i w dużej liczbie kopii w całej gastruli i w tkankach pozazarodkowych. Niewielką liczbę kopii mRNA wariantu mTLD wykryto w dojrzałych tkankach ludzkich, takich jak serce, płuca, mięśnie szkieletowe, wątroba, nerki, łożysko i mózg. mRNA wariantu BMP-1, z wyjątkiem mózgu, stwierdza się w tych samych dojrzałych tkankach co mRNA wariantu mTLD. Duże stężenia obu odmian mRNA występują w rozwijających się kościach w okresie ich mineralizacji oraz w całej mezenchymie rozwijających się

mysich płodów, a także w 17,5-dniowym łożysku [123]. Dużą liczbę kopii mRNA wariantu mTLD wykryto także w brzuszej części płytki wzrostowej cewy nerwowej, która generuje sygnały do wytwarzania wzorca brzuszno-grzbietowego zarodkowego układu nerwowego kręgowców [96]. Białko TLD u *Drosophila*, będące homologiem mTLD, bierze udział w rozwoju brzuszno-grzbietowym we wczesnej embriogenezie, co przez analogię tłumaczy największe wytwarzanie tego wariantu alternatywnego składania w rozwoju zarodkowym kręgowców [82]. Brak mRNA wariantu BMP-1 w rozwijającej się cewie nerwowej i dojrzałym mózgu oraz zróżnicowane rozmieszczenia wariantów mTLD i BMP-1 w łożysku wskazuje, że przynajmniej w niektórych tkankach te dwa warianty mogą pełnić różne role [123].

W łożysku w okresie rozwoju zarodkowego, a także w niewielkim stężeniu w rozwijających się kościach wykryto trzeci wariant alternatywnego składania genu *bmp1*, nazwany BMP-1/HIS [123]. Transkrypt ten różni się od wariantu BMP-1 obecnością dodatkowej niewielkiej domeny na końcu karboksylowym, która jest bogata w histydyny. Dotąd nie wykryto jednak produktu białkowego tego wariantu.

Możliwe, że istnieje więcej wariantów alternatywnego składania genu *bmp1*. W 1998 r. Janitz i wsp. [57] opublikowali doniesienie o wykryciu trzech kolejnych wariantów mRNA, krótszych i ze zmodyfikowanym końcem karboksylowym, które nazwano: BMP1-4, BMP1-5 i BMP1-6. mRNA kodujące wymienione warianty są przede wszystkim wykrywane w łożysku, ale także w innych tkankach rozwijającego się płodu i tkankach organizmów dojrzałych. Ich ekspresja jest jednak 5–100 razy słabsza niż białka BMP-1. W związku z tym odkryciem podejrzewa się, że warianty te mogą pełnić funkcje regulatorowe w stosunku do ekspresji/aktywności wariantów BMP-1/mTLD lub/oraz do białek BMP7, 8 i 9 (ryc. 1) [57].

Myszy pozbawione obu kopii genu *bmp1* giną przed narodzeniem, z dużymi zmianami spowodowanymi niezamknięciem się ściany brzusznej ciała i trwałym wpukleniem się żołądka [120]. Fenotyp ten prawdopodobnie wynika z nieprawidłowo zbudowanej, osłabionej macierzy pozakomórkowej u tych noworodków, a zwłaszcza z nieprawidłowej budowy włókien kolagenowych, co może uniemożliwiać komórkom mezodermalnym w obszarze pępka tworzenie odpowiednio zwartej macierzy zdolnej do wytrzyma-



nia ciśnienia wywieranego przez ekspansję wpuklającego się żołądka lub wypchanego po urodzeniu przez pracujące płuca [37]. Ponadto, skoro wariant BMP-1 ma także właściwości chordyno-lityczne, to prawdopodobnie funkcjonuje także jako czynnik wentralizujący i stąd niemożność zamknięcia powłok ciała może być spowodowana przez zaburzenie tworzenia prawidłowego wzorca brzuszno-grzbietowego [94, 107]. Warto również zaznaczyć, że defekt ten u myszy pozbawionych obu kopii genu *bmp1* przypomina defekt w rzadkiej chorobie noworodków ludzkich z *gastrochisis* – stan, w którym żołądek jest wpuklony do pępka, tworząc przepuklinę pępkową. Badania genetyczne, mimo przeglądu eksonów 2-15 w genie *bmp1* u 11 pacjentów z *gastrochisis* nie ujawniły jednak żadnej mutacji [65].

Wiele białek jest syntetyzowanych jako prekursorzy, a po-translacyjna proteolityczna obróbka do dojrzałych białek jest ważnym mechanizmem w regulacji ich biologicznej aktywności. Taką funkcję pełni również metaloproteinaza BMP-1/TLD, które są odpowiedzialne za proteolityczne dojrzewanie wielu białek macierzy pozakomórkowych, takich jak: różne kolageny włókienkowe, małe, bogate w leucynę proteoglikany, białka SIBLING i oksydaza lizylova, oraz są odpowiedzialne za wytwarzanie czynnika antyangiogenego z błony podstawnej o nazwie perlekan (ryc. 1).

Kolageny typów I, II i III są największymi włókienkowymi składnikami macierzy pozakomórkowej u kręgowców. Wszystkie trzy typy kolagenów są syntetyzowane jako prekursorzy, od których muszą być odcięte polipeptydy z końców, zarówno aminowego, jak i karbonylowego, zwane odpowiednio N- i C-propeptydami. Odcięcie tych polipeptydów umożliwia potrójnej helisie samoistne tworzenie włókien kolagenowych [99]. Za odcinanie N-propeptydów odpowiedzialne jest białko ADAMTS-2 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) oraz pokrewne proteiny [43]. C-endopeptydaza prokolagenu (wariant BMP-1) jest odpowiedzialna za odcinanie C-propeptydów (ryc. 1). Monomery kolagenu typu I, od których nie zostały odcięte C-propeptydy nie są wbudowywane do rosnących włókien kolagenowych [98] i dotąd nie wykryto żadnych dziedzicznych zaburzeń związanych z niezdolnością do odcinania C-końca prokolagenu. Prawdopodobnie niemożność odcinania C-propeptydu jest tak znacząca w procesie fibrylogenezy u człowieka, iż jest ona letalna. Blokujący samoskładanie włókien kolagenowych, efekt wywołany pozostawionymi C-propeptydami, jest prawdopodobnie wynikiem mniejszego powinowactwa takiego monomeru do już utworzonych włókien kolagenu. Wbudowanie niedojrzałych monomerów powoduje zahamowanie dalszego wzrostu włókien kolagenowych, czyli pakowanie wyższego rzędu [98]. Końcowym efektem takiego zaburzenia fibrylogenezy są włókna o mniejszej średnicy i długości, a więc o mniejszej wytrzymałości na działanie czynników mechanicznych i łatwiej oraz szybciej degradowane przez proteiny.

C-endopeptydaza prokolagenu przetwarza także prokolagen typu V i IX (ryc. 1). Zaskakujące okazało się to że, w przypadku proteolitycznej obróbki łańcuchów pro- $\alpha 1(V)$ , pro- $\alpha 3(V)$  [42] oraz pro- $\alpha 1(IX)$  [86], enzym odcina N-propeptyd, a C-końiec jest przetwarzany przez

białka SPC. C-propeptyd łańcucha pro- $\alpha 2(V)$  zgodnie z ogólnym schematem dojrzewania kolagenów włókienkowych jest odcinany przez białko BMP-1. W tym wypadku nie scharakteryzowano do tej pory białka odcinającego N-propeptyd [42].

Metaloproteiny BMP-1/TLD wydają się ważne w formowaniu włókien kolagenowych przez odcinanie N-końcowych globularnych sekwencji łańcuchów pro- $\alpha 1(V)$  do ich właściwych rozmiarów i konfiguracji; przez odcinanie C-propeptydów od łańcuchów prokolagenów I, II i III oraz przez odcinanie C-propeptydu łańcucha pro- $\alpha 2(V)$ . Cięcie dwóch typów propeptydów przez tę samą proteinę może być sposobem regulacji i koordynacji rozmieszczenia kolagenu typu I i V w tym samym włóknie.

Kolejnym kolagenem przetwarzanym przez białko BMP-1 jest kolagen VII, będący głównym składnikiem włókien kotwiczących związanym z mocowaniem tkanek epitelialnych do błon podstawnych, takich jak komórki naskórka do macierzy skóry właściwej (ryc. 1). Mutacje w kolagenie VII powodują zaburzenia lub brak włókien mocujących, co prowadzi do ostrej postaci pęcherzowego oddzielenia naskórka (DEB) [17]. Proteolityczna obróbka C-propeptydu prokolagenu VII jest konieczna do właściwego tworzenia włókien mocujących. Badania *in vitro* wykazały, że wariant BMP-1 jest zdolny do cięcia prokolagenu VII. Nie ma dotąd danych o takich właściwościach enzymu mTLD, chociaż u myszy *bmp1*-null nie wykryto zaburzeń w budowie kolagenu VII, co wskazuje, że albo białko to nie pełni tej funkcji *in vitro* lub mTLL1, mające tę samą aktywność, jest w stanie zastąpić białko BMP-1 u mysich mutantów [127]. Prokolagen VII jest wytwarzany przez keratynocyty, ale większość prokolagenu VII jest przetwarzana przez fibroblasty umiejscowione w pobliżu połączenia skóra-naskórek [101].

Następną grupą białek, które podlegają obróbce przez proteiny BMP-1/TLD są dwa białka zaliczane do małych bogatych w leucynę proteoglikanów (small leucine-rich proteoglycans – SLRP), które wiążą się z kolagenem typu I i regulują fibrylogenezę (ryc. 1). SLRP można podzielić na cztery klasy w oparciu o homologię sekwencji i struktur domen białkowych. Na podstawie badań *in vitro* stwierdzono, że BMP-1 skutecznie tnie białka należące do pierwszej (dekoryna i biglikan) i czwartej klasy (epifikan i osteoglicyna) (ryc. 1) [43]. Biglikan i dekoryna występują w macierzy budującej zrąb kości i nieskieletowych tkanek łącznych. Biglikan występuje w pobliżu komórek, a dekorynę wykrywa się w połączeniu z włókienkami kolagenu typu I [12]. Dekoryna i osteoglicyna silnie hamują fibrylogenezę kolagenu typu I oraz stopień końcowego skręcenia włókien, natomiast biglikan przyspiesza fibrylogenezę [39]. Udowodniono, że zdolność proosteoglicyny do regulacji fibrylogenezy *in vitro* jest znacznie efektywniejsza po jego obróbce przez białko BMP-1. Stąd obróbka białek pro-SLRP do dojrzałych postaci przez enzym BMP-1 może być jednym ze sposobów nadzorowania funkcji tych proteoglikanów w regulacji rozwoju i późniejszych czynności tkanki łącznej oraz w fibrylogenezie kolagenu [39].

Oksydazy lizylova (LOX) są oksydazami aminowymi, których aktywność zależy od obecności w ich struktu-

rze jonów miedzi. Są one wydzielane przez fibrogeniczne komórki, takie jak fibroblasty i komórki mięśni gładkich. Utleniają one pierwotne substraty aminowe do reaktywnych aldehydów [110]. Oksydazy lizylowe wykazują aktywność tworzenia wiązań krzyżowych i katalizowania aktywności innych enzymów związanych z obróbką kolagenu i elastyny [110]. W genomach ssaków znajduje się 5 genów potencjalnych członków rodziny LOX, takich jak prototypowy enzym LOX, a także białka LOX-podobne (LOX-like 1-4 - LOXL1, -2, -3 i -4) [59]. Oksydazy lizylowe są syntetyzowane jako zymogeny lub proenzymy i usunięcie ich NH<sub>2</sub>-końcowych domen jest konieczne do aktywacji enzymu i osiągnięcia pełnej aktywności enzymatycznej [125].

Kurza C-proteinaza prokolagenu odcina w zymogenach LOX propeptyd, wytwarzając oksydazę lizylową z N-końcem identycznym do dojrzałego LOX (ryc. 1) [93]. Wykazano dotychczas, że ludzkie metaloproteinazy BMP-1/mTLD są zdolne do proteolitycznego aktywowania zymogenów LOX [126] oraz LOXL1 [15] do aktywnych oksydaz lizylowych. Białka BMP-1/TLD są odpowiedzialne za większość obróbki proteolitycznej i aktywacji białek LOX *in vivo* [126]. Enzymy LOX i LOXL1 są wykrywane w większości tkanek, podczas gdy występowanie pozostałych LOXL 2, 3 i 4 wydaje się swoiste tkankowo. mRNA LOX najczęściej i w największej liczbie kopii występuje w sercu, płucach i nerkach, podczas gdy mRNA LOXL1 stwierdza się w sercu, łożysku, trzustce i mięśniach szkieletowych [88]. Istnieją przesłanki wskazujące, że LOXL1 może działać przede wszystkim jako przewodnik osadzania elastyny w ściśle określony przestrzennie sposób, podczas gdy ekspresja LOX jest powiązana z jej rolą w katalizowaniu wiązań krzyżowych między elastyną i kolagenem [78]. Stąd zdolność enzymów BMP-1/TLD-podobnych do cięcia i aktywowania białek z grupy LOX *in vitro* i *in vivo* wskazuje na jeszcze jeden sposób, w jaki proteinazy BMP-1/mTLD wpływają na tworzenie i kontrolę jakości macierzy pozakomórkowej.

Kolejną grupą białek, przetwarzaną przez białka BMP-1/TLD jest rodzina białek niekolagenowych macierzy – SIBLING (small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein) (ryc. 1). Do rodziny tej należą osteopontyna (OPN), sialoproteina kości (BSP), białko macierzy dentyiny 1 (DMP1), fosfoproteina macierzy zewnątrzkomórkowej (MEPE) oraz sialofosfoproteina dentyiny (DSPP) [32]. Białka SIBLING mają wspólne cechy, takie jak: występowanie, przede wszystkim w kościach i dentyinie, motywy RGD pośredniczące w oddziaływaniach z integrzynami powierzchniowymi komórek oraz niektóre modyfikacje potranslacyjne. Białka SIBLING są mocno fosforylowane i zawierają znaczny ładunek elektryczny [100]. Białka te, a zwłaszcza DMP1 i DSPP, które są najbardziej rozpowszechnionymi niekolagenowymi białkami macierzy dentyiny są powiązane z inicjowaniem mineralizacji tkanki osteoidalnej i predentyiny, głównie przez ich domeny wiążące jony wapnia i mające w składzie przewagę aminokwasów o charakterze kwasowym [19]. BMP-1 aktywnie rekombinowany ludzki DMP1, w wyniku czego powstają odcinki peptydowe podobne do peptydów izolowanych z kości [114].

Substratami enzymów BMP-1/mTLD są także niektóre białka błony podstawnej, takie jak laminina (laminin

basement membrane proteins), które pełnią główną rolę w morfogenezie i regulowaniu funkcjonowania komórek (ryc. 1). Lamininy są heterotrimerami zbudowanymi z łańcuchów  $\alpha$ ,  $\beta$ , i  $\gamma$  połączonych mostkami dwusiarczkowymi, tworzącymi kształt krzyża (cruciform). Zidentyfikowano 16 izoform lamininy z różnymi kombinacjami łańcuchów (5 łańcuchów  $\alpha$ , 3 łańcuchy  $\beta$ , 3 łańcuchy  $\gamma$ ) [26]. Duża globularna (large globular – LG) domena na C-końcu łańcucha  $\alpha$  jest głównym miejscem oddziaływającym z receptorami na powierzchni komórek, takimi jak: integryny i syndekany. Natomiast N-końcowe odcinki polipeptydów wszystkich trzech łańcuchów oddziałują ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej [26].

Laminina 5 zbudowana z łańcuchów  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$  i  $\gamma 2$  jest wytwarzana tylko przez komórki nabłonka i jest ona głównym składnikiem włókien mocujących, które wiążą podstawy keratynocytów z połączeniem skóra-naskórek. Brak któregośkolwiek produktu jednego z 3 genów kodujących łańcuchy lamininy 5, powoduje letalne pęcherzowe oddzielenie się naskórka typu Herlitz [25]. Ponadto laminina 5 jest jednym z czynników uczestniczących w powstawaniu kości, przez promowanie proliferacji i supresję różnicowania chondroidalnego mezenchymalnych komórek macierzystych [48]. Białka BMP-1/mTLD tną łańcuchy  $\gamma 2$  [3] oraz  $\alpha 3$  [127], przy czym to wariant mTLD jest enzymem, który głównie podlega ekspresji w keratynocytach [127] i stąd jego główna rola w obróbce lamininy 5, przynajmniej w skórze/keratynocytach. Regulacja obróbki/dojrzenia i rozmieszczenia lamininy 5 jest ważna do rozkładu i ponownego złożenia hemidesmosomów w leczeniu ran [10]. Rozerwanie hemidesmosomów może być warunkiem wstępnym nie tylko w prawidłowej migracji komórek epitelialnych, ale także w przerzutowaniu komórek nowotworowych. Wyniki kilku niezależnych badań wykazały pozytywną korelację pomiędzy ekspresją lamininy 5 a rozwojem i inwazyjnością guzów [60].

Jeszcze innym substratem białek BMP-1/mTLD jest perlekan zaliczany do rodziny głównych proteoglikanów błony podstawnej (basement membrane heparin sulfate proteoglycan – HSPG) (ryc. 1). Jest to duży modułarny proteoglikan, którego domeny są podobne do domen czynników wzrostu i białek związanych z metabolizmem lipidów, adhezją i oddziaływaniami typu białko-białko [56]. Perlekan wykrywa się we wczesnych stadiach rozwoju większości unaczynionych tkanek, ale także w nieunaczynionej chrząstce [56]. Myszy pozbawione obu kopii genu kodującego perlekan ginęły 10,5 dnia po poczęciu, z powodu zwiększonego ciśnienia krwi, a zaledwie kilka, które dotrwały żywe do urodzenia zginęło z powodu skrajnych nieprawidłowości układu krwionośnego i defektów w układzie sercowo-naczyniowym.

C-końcowy, proteolityczny odcinek białka o wielkości 85 kDa, zawierający domenę V perlekanu, zwany endorepeleiną, ma aktywność antyangiogenną [89]. Tak więc, dodatkowo do swej rodzimej roli w tworzeniu układu sercowo-naczyniowego, perlekan może być źródłem proteolitycznie tworzonych C-końcowych polipeptydów o działaniu antyangiogennym (C-terminal-derived antyangiogenic proteolytic fragments). Według niektórych doniesień proteoglikan ten może odgrywać podwójną rolę w angiogenezie, albowiem jego łańcuchy boczne zbudowane głównie z siarczanów he-





paryny mogą działać jako proangiogenne czynniki przez modulację czynników wzrostu, takich jak FGF i śródbłonkowy naczyniowy czynnik wzrostu (vascular endothelial growth factor – VEGF) [56]. Wykazano, że domena LG3 (laminin-like globular), odpowiedzialna za aktywność antyangiogenną u endorepeli [13], jest odcinana *in vitro* w fizjologicznym miejscu cięcia przez białka BMP-1/mTLD, oraz że u myszy *bmp1*-null nie wykryto proteolitycznej obróbki perlekanu [41]. Stąd białka BMP-1/mTLD są powiązane z obróbką proteoglikanów błon podstawnych i uwalnianiem czynników antyangiogennych.

Porównanie liczby kopii mRNA kodującego BMP-1/mTLD w śródbłonku naczyń guzowych do liczby jego kopii w śródbłonku odpowiadających im prawidłowych tkanek ujawniło znacznie większą liczbę kopii mRNA w tkankach nowotworowych [113]. Można się więc pokusić o stwierdzenie, że BMP-1/mTLD mogą być związane z działalnością kompensacyjną, która reguluje angiogenezę w odpowiedzi na zmieniające się warunki, nie tylko przez zdolność do zwiększania przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej, która towarzyszy angiogenezie, ale także przez zdolność do proteolitycznego odcinania polipeptydu antyangiogennego z perlekanu. Ta ostatnia aktywność może być podstawą mechanizmu, dzięki któremu organizm chorego próbuje odpowiadać na nieregulowaną angiogenezę związaną z rozrostem guza [37].

#### **FUNKCJONALNE ZWIĄZKI BIAŁEK BMP-1/mTLD Z NADRODZINA TGF- $\beta$ I INNYMI REGULATORAMI METABOLIZMU MACIERZY POZAKOMÓRKOWEJ**

Białka BMP-1/mTLD są powiązane z regulacją czynników wzrostu (ryc. 1). Nadrodzinę TGF- $\beta$  można podzielić na dwie podgrupy w oparciu o homologię sekwencji, receptorów i wewnątrzkomórkowych cząsteczek sygnałowych, na które oddziałują. BMP/wzrostowe i różnicujące czynniki (GDF)/substancje hamujące Mullerian (MIS) oraz TGF- $\beta$ /Actin/Nodal. Te dwie podgrupy wiążą się do odrębnych receptorów typu I i II i aktywują szlak Smad2 i 3 (podrodzina TGF- $\beta$ ) lub szlak sygnałowy Smad1, 5 i 8 (podrodzina BMP) [84]. Regulacja szlaku sygnałowego przez rodzinę czynników wzrostu TGF- $\beta$  odbywa się zarówno zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowo, przez użycie inhibitorów Smad6 i 7, pseudoreceptorów i zewnątrzkomórkowych antagonistów [11].

Białka TGF- $\beta$  są cytokinami pełniącymi różnorodne, ważne funkcje w modulowaniu proliferacji komórek i różnicowania, apoptozie, odpowiedzi immunologicznej, naprawie komórek i tworzeniu macierzy zewnątrzkomórkowej [36]. TGF- $\beta$  jest prototypem nadrodziny cytokin, spokrewnionych ze względu na homologię struktury i sekwencji, która może być podzielona na podgrupy oparte na stopniu ich pokrewieństwa [30]. Działanie białek z rodziny TGF- $\beta$  jest ściśle kontrolowane przez różne inhibitory wewnątrzkomórkowe, zewnątrzkomórkowe oraz obecne na powierzchni komórki [83,134]. Działanie TGF- $\beta$ 1 oraz GDF8 i 11 jest także blokowane przez tworzenie niekowalencyjnych latentnych kompleksów pomiędzy funkcjonalnym ligandem oraz jego odcinaną prodomeną [38,130], określaną jako peptyd odpowiedzialny za latencję (latency associated peptide – LAP) [5]. TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 i - $\beta$ 3 są wytwarzane jako duże latentne kompleksy (LLC), w których LAP jest połączony

wiązaniem dwusiarczkowymi z białkiem wiążącym latentny TGF- $\beta$  (latent TGF- $\beta$ -binding protein – LTBP), który u ssaków występuje w czterech odmianach. Chociaż rola LTBP nie jest do końca wyjaśniona, wydaje się, że służy one do wiązania latentnych kompleksów TGF- $\beta$  do macierzy pozakomórkowej, prawdopodobnie przez kowalencyjne wiązanie LTBP do jej składników [91]. Ge i wsp. [36] opisali, że BMP-1 aktywuje TGF- $\beta$ 1 przez bezpośrednią hydrolizę w LTBP1 dwóch swoistych wiązań peptydowych, co powoduje uwolnienie kompleksu latentnego z macierzy zewnątrzkomórkowej i następującą po tym aktywację TGF- $\beta$ 1 przez odcięcie LAP przez metaloproteinazę macierzy. Ponieważ synteza białek BMP-1/TLD-podobnych jest indukowana przez TGF- $\beta$ 1 [70], rola obydwu metaloproteinaz w aktywacji TGF- $\beta$ 1 „zamyka” tę nową pętlę regulacyjną przebudowy tkanek u kręgowców. Co więcej, metaloproteinazy BMP-1/TLD-podobne można określić mianem regulatorów zdolnych do zarządzania aktywnością TGF- $\beta$  w budowie macierzy pozakomórkowej, regulacji wzorca rozwoju i kontroli wzrostu tkanki mięśniowej i nerwowej na zasadzie ujemnego sprzężenia.

GDF8 (miostatyna) i GDF11, podobnie jak TGF- $\beta$ 1, są syntetyzowane jako latentne cząsteczki wymagające do aktywacji odcięcia prodomeny [38,130]. Nie wiadomo jednak, jakie dokładnie proteazy aktywują te czynniki *in vivo*. Wyniki badań *in vitro* nad aktywacją GDF8 i 11 wskazują, że ich aktywacja może być egzekwowana przez cięcie wewnątrz prodomeny przez BMP-1/mTLD (ryc. 1) [38,130].

U myszy, GDF8 jest syntetyzowany w rozwijających się mięśniach szkieletowych przez cały okres rozwoju zarodka, a u dorosłych zwierząt pojawia się w mięśniach szkieletowych i w małym stężeniu w tkankach tłuszczowych [71]. Prawdopodobnie pełni on bliżej nieznaną funkcję w regulacji rozwoju i/lub określeniu funkcji tych tkanek. Miostatyna działa jako „chalone”, tkankowo wydzielany czynnik, który ogranicza wzrost tej samej tkanki, w której jest wydzielany na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego [18], a więc w tym przypadku nadzoruje wzrost mięśni szkieletowych podczas rozwoju, a później również w dorosłym organizmie [72].

GDF11 spełnia inną rolę podczas rozwoju i w dorosłych organizmach. Prawdopodobnie bierze udział w ustalaniu wzorca tył-przód [85]. Pełni też ważną rolę w organogenezie nerki [31], części wewnątrzwydzielniczej trzustki [46] oraz w indukcji powstawania mezodermy [85]. Dodatkowo, najważniejszą rolą GDF11 wydaje się regulacja rozwoju neuronalnego, przez nadzór rozwoju tkanki nerwowej i homeostazy [33]. Wydaje się on działać jako „chalone” w kontroli dojrzewania neuronalnego nabłonka węchowego [132] i siatkówki oka [64].

Poza białkami BMP-1/mTLD, które tną *in vitro* wewnątrz prodomeny, przez co uwalniają i aktywują GDF8 i 11 [38,130], aktywność cięcia tych prodomen wykazuje również mTII2, metaloproteinaza, która jest swoiście syntetyzowana podczas rozwoju zarodkowego w mięśniach szkieletowych [130]. Wydaje się więc, że *in vivo* to właśnie mTII2 mogła być swoistym regulatorem aktywności GDF8 i 11.

Białka regulatorowe BMP-2/-4, które również są zaliczane do nadrodziny TGF- $\beta$ , mają wpływ na tworzenie wzor-



ca grzbieto-brzuszny podczas rozwoju embrionalnego; są czynnikami wentralizującymi, przez co kierują komórki w stronę tworzenia brzusznej powierzchni ciała. BMP-4 blokuje indukcję szlaku nerwowego komórek w ektodermie, a blokerami jego aktywności są białka: chordyna i noggin. Enzym BMP-1 tnie chordynę w kilku miejscach i przez to uwalnia aktywny BMP-4 z latentnego kompleksu BMP: chordyna/SOG, zarówno u kręgowców, jak i bezkręgowców (ryc. 1). Sądzi się, że dyfuzja chordyny u kręgowców i SOG u bezkręgowców, z centralnego miejsca syntezy tworzy gradient hamujący, który na zasadzie sprzężenia zwrotnego tworzy odwrócony gradient szlaku sygnałowego BMP, co prowadzi do formowania grzbieto-brzusznej osi ciała [95]. Wyniki badań prowadzonych *in vitro* wykazały, że to białko BMP-1, a nie dłuższy wariant mTLD tnie chordynę [107]. Nadekspresja wariantu BMP-1 wywołuje podobny efekt jak nadekspresja chordyny, czyli dorsalizację zarodków [107]. Białko Tsg (twisted gastrulation) jest kofaktorem zdolnym do wzmacniania lub blokowania ścieżki z udziałem BMP, zależnie od otoczenia i okoliczności [92]. Tsg wiąże się z kompleksem BMP-4:chordyna, na zasadzie współdziałania z chordyną i przez to hamuje aktywność BMP-4 [67]. Jednak obecność Tsg w kompleksie przyspiesza/ułatwia cięcie chordyny przez enzym BMP1, a więc aktywuje tę ścieżkę sygnałową (ryc. 1) [67]. Tsg może działać jako modulator i stabilizator mechanizmu molekularnego, dzięki któremu u kręgowców i bezkręgowców osiągnany jest wzorzec grzbieto-brzuszny.

Najnowsze badania Jasuja i wsp. [58] wskazują, że prodomena wariantu BMP-1 wiąże się także bezpośrednio z białkami BMP-2 i -4 z dużą swoistością i dużym podobieństwem do reakcji z chordyną. Oddziaływania te odbywają się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Badacze sugerują, że sekwencja prodomeny wariantu BMP-1 może służyć jako łącznik kompleksu BMP-2/-4 z innymi cząsteczkami. Ponadto, skoro właściwości kompleksu BMP-2/-4 związanego z prodomeną białka BMP-1 różnią się od właściwości kompleksu niezwiązanego z nią, to prodomena ta ma właściwości modulujące szlak sygnałowy BMP-2/-4 w złożony sposób, podobnie jak Tsg czy inne białko wiążące BM-2/-4, zwane crossveinless 2 [58].

#### REGULATORY AKTYWNOŚCI PROTEOLITYCZNEJ BIAŁEK BMP-1/mTLD I ICH WPŁYW NA MACIERZ POZAKOMÓRKOWĄ

Początkowa charakterystyka aktywności pCP z pożywką hodowlanej fibroblastów mysiej skóry wykazała, że aktywność ta jest wzmacniana przez glikoproteinę 55 kDa, nazywaną wzmacniacz C-proteinazy prokolagenu 1 (procolagen C-proteinase enhancer 1 – PCPE1) [1, 62]. PCPE1 zawiera 2 N-końcowe domeny CUB i C-końcową domenę netrynową (NTR) [122], która działa podobnie jak białka z rodziny TIMP. Drugim białkiem wykazującym działanie wzmacniające aktywność C-proteinazy prokolagenu jest białko odkryte przez Steiglitza i wsp. i nazwane przez nich PCPE2 [115].

Gen kodujący białko PCPE1 – *PCOLCE1* ulega natężonej ekspresji w całej rozwijającej się mezenchymie, a zwłaszcza podczas mineralizacji kości, a więc w tkankach bogatych w kolagen typu I [115], podczas gdy białko PCPE2 jest wykrywane przede wszystkim w niezmineralizowanej chrząstce, która jest bogata w kolagen typu II. Nie za-

ważono jednak preferencji PCPE do żadnego z kolagenów, co może oznaczać, że swoistość działania tych białek jest wywołana zróżnicowaną ekspresją w tkankach [115]. PCPE są białkami prekursorowymi, których produkty cięcia pełnią podwójną rolę w metabolizmie kolagenu, a mianowicie przez:

- 1) wzmacnianie dojrzewania prokolagenu przez N-końcowe CUB domeny,
- 2) ochronę kolagenu przed degradacją przez C-terminalną domenę netrynową [90,122].

PCPE nie mają swoistej aktywności pCP, raczej ułatwiają one cięcie prokolagenu przez wiązanie się do niego i zmianę jego konformacji, która ułatwia dostęp C-proteinazie prokolagenu do wiązania peptydowego [104]. PCPE wydają się swoiste dla aktywności C-proteinazy prokolagenu i dotychczas nie wykryto, by wzmacniały cięcie innych substratów białkowych z podrodziny BMP-1/TLD [87]. Odkrycie, że białka PCPE mogą się wiązać do włókien kolagenowych w tkankach [115] wskazuje na możliwość, że PCPE są wbudowywane do już utworzonych włókien kolagenowych i stąd wpływają na ich morfogenezę przez zmianę ich właściwości powierzchniowych i oddziaływania z innymi częściami macierzy, a także przez wzmacnianie aktywności pCP przy aktywacji monomerów kolagenowych. PCPE1 jest ważnym determinantem morfologii włókien kolagenowych w mineralizowanych i niezmineralizowanych tkankach [116]. Najnowsze badania wykazały, że PCPE1 wzmacnia aktywność proteolityczną białek BMP-1/mTLD nie tylko przez wiązanie do prokolagenu I, ale także przez wiązanie się z karboksylowymi końcami enzymów mTLD i BMP-1, a ściślej z CUB3 w BMP-1 i EGF2-CUB4-CUB5 w mTLD [40]. To, że PCPE wiąże zarówno enzym C-endopeptydazę prokolagenu, jak i prokolagen otwiera pole do spekulacji, że białko to może być związane w kompleks z powyższymi cząsteczkami, i w ten sposób pomaga łączyć się proteinazie i substratowi w sposób, który pozytywnie wpływa na cięcie. Istnienie takiego kompleksu jest zgodne z dowodami na to, że PCPE-1 wzmacnia jedynie aktywność białek BMP-1/mTLD jako C-proteinazy prokolagenu, a nie czyni tego z innymi substratami [40]. PCPE-1 wiąże się przez domenę CUB do nietrójhelikalnego telopeptydu w regionie N-terminalnym w pobliżu wiązania peptydowego hydroлизованego przez BMP-1, co w połączeniu z wiązaniem się do C-propeptydu powoduje zmianę konformacji białka i w ten sposób ułatwia działanie enzymu. Aktywność PCPE-1 wymaga obecności jonów wapnia, które są związane w domenie CUB1. Interesujące jest to, że PCPE-1 wiąże oba produkty cięcia uwalniane przez BMP-1, zarówno pN-collagen jak i trzy odcięte łańcuchy C-propeptydu. Możliwe jest, że PCPE wiąże się z C-propeptydem i C-telopeptydem, by wymusić zmianę konformacyjną prokolagenu [14].

*Locus* genu *PCOLCE* u człowieka to 7q22, w obszarze często podlegającym aberracjom w komórkach guzów *leiomyoma* [133]. Wykazano, że zaburzenia niektórych genów związanych z macierzą, takich jak geny kodujące TIMP3 i łańcuch pro $\alpha$ 2 prokolagenu I [4], mogą prowadzić do utraty zdolności zahamowania wzrostu i/lub funkcji supresyjnych guza, które to zaburzenia mogą prowadzić do rozwoju guzów mięśni gładkich [136]. Zaburzenie prawidłowej ekspresji *PCOLCE* może zatem pełnić rolę w etiologii *leiomyoma*. Gen *PCOLCE* w trakcie rozwo-



ju zarodkowego podlega ekspresji w tych samych tkankach, co gen *bmp1*, przy czym jego ekspresja jest silniejsza w tkankach płodowych, a zwłaszcza w macicy. Duża liczba kopii mRNA białek PCPE, BMP-1 i mTLD w trakcie rozwoju zarodkowego wskazuje na to, że białka te mogą pełnić dodatkowe funkcje oprócz obróbki prokolagenu I. Największą liczbę kopii mRNA wykryto w macicy, co jest zgodne z proponowaną rolą białka PCPE w etiologii *leiomyoma* [108].

Początkowe wyniki badań, wskazujące na małą aktywność pCP w tkankach i hodowlach komórkowych skłoniły badaczy do sformułowania wniosku, iż enzym ten jest wydzielany jako nieaktywny prekursor lub też, że zachodzi koekspresja z hipotetycznym endogennym inhibitorem [52]. Wyniki dalszych badań dostarczyły argumentów na podtrzymanie hipotezy endogennego inhibitora [70]. Wykazano, że syntetyczne swoiste inhibitory z grupy hydroksymatów blokują aktywność pCP, czego wynikiem jest zaburzone rozmieszczenie kolagenów w tkankach i hodowlach komórkowych [27,105]. U jeżowca morskiego inhibitory te blokują gastrulację [53], głównie z powodu nieprawidłowego rozmieszczenia kolagenu w blastocelu. Inhibitory te także przyspieszają różnicowanie neuronalne przez blokanie aktywności GDF11 wzbudzonej przez białka BMP-1/mTLD [38] oraz hamują obróbkę prolamininy 5 [127]. Obszar terapeutycznych zastosowań tych małych cząsteczek blokujących zależy od tego, jakiego typu właściwości farmakokinetyczne wykażą one *in vivo*.

Pierwszym wykrytym endogennym inhibitorem była  $\alpha 2$ -makroglobulina ( $\alpha 2M$ ). Białko to jest członkiem rodziny  $\alpha$ -makroglobulin osocza białka jaj wielu gatunków. Ludzka  $\alpha 2M$  jest wykrywana w dużym stężeniu w osoczu, a wytwarzana jest przez hepatocyty oraz inne komórki, takie jak: fibroblasty płuc, makrofagi, astrocyty i komórki nowotworowe. Białko to jest tetramerem złożonym z czterech identycznych podjednostek. Każda z tych podjednostek eksponuje „przynętę” (bait region), którym jest odcinek polipeptydowy z miejscami cięcia dla wielu proteinaz. Cięcie w tym regionie powoduje obniżenie wysoce reaktywnego tioesteru, który nieodwracalnie wiąże się z przecinającą proteinazą i blokuje jej dalszą aktywność [135].

Drugi endogenne inhibitor wykryto w trakcie badań nad regulacją tworzenia wzorca grzbieto-brzusznego u *Xenopus*. Jest to domena Frizzled białka Sizzled/ogon sFRP. Białko to jest kompetytywnym inhibitorem proteolitycznej funkcji białka BMP-1. Białko Sizzled/ogon wiąże się z podobną do chordyny efektywnością, do miejsca aktywnego enzymu, przy czym nie podlega obróbce enzymatycznej [69].

## PODSUMOWANIE

Opisane liczne swoiste i mniej swoiste działania C-endo-peptydazy prokolagenu w mechanizmach regulujących budowę i przebudowę macierzy pozakomórkowej oraz jej

kontroli sprawia, że wydaje się uprawnione twierdzenie, iż enzymy z rodziny BMP-1/mTLD mogą mieć ważny udział w niekontrolowanym rozroście tkanek o dużej zawartości macierzy pozakomórkowej, takich jak mięśniaki macicy. Precyzyjna kontrola ich ekspresji przez układ hormonów płciowych i regulujących cykl miesięczny wydaje się mieć podstawowe znaczenie w utrzymaniu pod kontrolą rozrostu błony śluzowej macicy w przebudowie nabłonka w cyklu miesięcznym kobiety. Zaburzenie tej regulacji, będące wynikiem przestrojenia hormonalnego organizmu kobiety w okresie okołomenopauzalnym, lub w przypadkach nietrafionej zastępczej terapii hormonalnej, może spowodować utratę kontroli nad prawidłową kontrolą, regeneracji, odbudowy i przebudowy macierzy pozakomórkowej w macicy. Może dochodzić do zwiększonego wytwarzania monomerów kolagenu wywołanego przez czynniki z rodziny TGF- $\beta$ , okresowe wahania stężeń BMP-1/mTLD w macierzy pozakomórkowej, zwłaszcza w pobliżu błon podstawnych mogą prowadzić do obniżenia aktywności związanej z uwalnianiem z perlekanu peptydu antyangiogenego, co będzie sprzyjało przerastaniu guza naczyńmi krwionośnymi. Ponieważ produktem genu BMP-1 mogą być co najmniej trzy różne końcowe polipeptydy, ważne jest poznanie, które z nich i jak są wytwarzane w takich guzach jak mięśniaki macicy. Gdyby się okazało, że w określonych fazach cyklu miesięcznego, warianty BMP-1/mTld uwalniające peptyd antyangiogeny pojawiają się w wyższym stężeniu, mogłoby to tłumaczyć niezłśliwy charakter *leiomyoma*.

Mimo licznych doniesień zarówno na temat biologii metaloproteinaz z rodziny metacynkin, jak i na temat mięśniaków macicy, nadal istnieje wiele luk w poznaniu mechanizmów i ich zaburzeń wpływających na proliferację komórek nowotworowych w guzach litych oraz pytań pozostających bez odpowiedzi o mechanizmy regulujące komunikowanie się komórek między sobą i znaczenie macierzy w tym procesie w sytuacjach prawidłowych i w guzach nowotworowych. Poznanie tych mechanizmów pozwoliłoby trafniej wybrać cele terapii antynowotworowej wspomagającej leczenie pooperacyjne i zapobiegającej wznowom nowotworowym. Jednym z takich celów mogłyby być metaloproteinazy BMP-1/mTLD. Ich złożona budowa domen poza centrum katalitycznym wydaje się je predestynować do poszukiwania swoistych blokerów ich aktywności w wybranych stanach patologicznych. Rozpoznanie miejsc oddziaływania ze wzmacniaczem aktywności proteolitycznej BMP-1/mTLD (PCPE) daje nadzieję, że uda się zaprojektować również bloker tej aktywności, który będzie konkurował z substratem o miejsce jego swoistego rozpoznania.

Kwestią do rozwiązania jest oczywiście sposób dostarczenia takiego blokera do miejsca w którym działa, gdyż aktywność metaloproteinaz BMP-1/mTLD jest stale potrzebna w miejscach fizjologicznej przebudowy macierzy pozakomórkowej tkanek i niekorzystne byłoby zaburzenie ich homeostazy przez niekontrolowane wprowadzenie blokera aktywności tych enzymów.

## PIŚMIENICTWO

[1] Adar R., Kessler E., Goldberg B.: Evidence for a protein that enhances the activity of type I procollagen C-proteinase. Coll. Relat. Res., 1986; 6: 267–277

[2] Al-Hendy A., Salama S.: Gene therapy and uterine leiomyoma: a review. Human Reprod. Update, 2006; 12: 385–400

- [3] Amano S., Scott I.C., Takahara K., Koch M., Champlaud M.F., Gerecke D.R., Keene D.R., Hudson D.L., Nishiyama T., Lee S., Greenspan D.S., Burgeson R.E.: Bone morphogenetic protein 1 is an extracellular processing enzyme of the laminin 5  $\gamma 2$  chain. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 22728–22735
- [4] Andreu T., Beckers T., Thoenes E., Hilgard P., von Melchner H.: Gene trapping identifies inhibitors of oncogenic transformation. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 13848–13854
- [5] Annes J.P., Munger J.S., Rifkin D.B.: Making sense of latent TGF- $\beta$  activation. *J. Cell. Sci.*, 2003; 116: 217–224
- [6] Arici A., Sozen I.: Transforming growth factor- $\beta 3$  is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation. *Fertil. Steril.*, 2000; 73: 1006–1011
- [7] Arici A., Sozen I., Attar R., Engin O., Buradagunta S., DeDios N.: Modulation of transforming growth factor- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) expression in myometrium and leiomyoma. ASRM 1995 Annual Meeting Program Supplement, 1995: S9
- [8] Arici A., Sozen I., Olive D.: Modulation of transforming growth factor- $\beta 3$  (TGF- $\beta 3$ ) expression in myometrium and leiomyoma. AFS 1994 Annual Meeting Program Supplement, 1994: S31–S32
- [9] Arslan A.A., Gold L.L., Mittal K., Suen T.-C., Belitskaya-Levy I., Tang M.S., Toniolo P.: Gene expression studies provide clues to the pathogenesis of uterine leiomyoma: new evidence and a systematic review. *Hum. Reprod.*, 2005; 20: 852–863
- [10] Baker S.E., Hopkinson S.B., Fitchmun M., Andreason G.L., Frasier F., Plopper G., Quaranta V., Jones J.C.: Laminin-5 and hemidesmosomes: role of the  $\alpha 3$  chain subunit in hemidesmosome stability and assembly. *J. Cell. Sci.*, 1996; 109: 2509–2520
- [11] Balemans W., Van Hul W.: Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev. Biol.*, 2002; 250: 231–250
- [12] Bianco P., Fisher L.W., Young M.F., Termine J.D., Robey P.G.: Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 1990; 38: 1549–1563
- [13] Bix G., Fu J., Gonzalez E.M., Macro L., Barker A., Campbell S., Zutter M.M., Santoro S.A., Kim J.K., Höök M., Reed C.C., Iozzo R.V.: Edorepellin causes endothelial cell disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions through  $\alpha 2 \beta 1$  integrin. *J. Cell. Biol.*, 2004; 166: 97–109
- [14] Blanc G., Font B., Eichenberger D., Moreau C., Ricard-Blum S., Hulmes D.J., Moali C.: Insights into how CUB domains can exert specific functions while sharing a common fold. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 16924–16933
- [15] Borel A., Eichenberger D., Farjanel J., Kessler E., Gleyzal C., Hulmes D.J., Sommer P., Font B.: Lysyl oxidase-like protein from bovine aorta. Isolation and maturation to an active form by bone morphogenetic protein-1. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 48944–48949
- [16] Bork P., Beckmann G.: The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *J. Mol. Biol.*, 1993; 231: 539–545
- [17] Bruckner-Tuderman L., Hopfner B., Hammami-Hauasli N.: Biology of anchoring fibrils: lessons from dystrophic epidermolysis bullosa. *Matrix Biol.* 1999; 18: 43–54
- [18] Bullough W.S.: Mitotic and functional homeostasis: a speculative review. *Cancer Res.* 1965; 25: 1683–1727
- [19] Butler W.T.: Dentin matrix proteins. *Eur. J. Oral Sci.*, 1998; 106 (Suppl. 1): 204–210
- [20] Canevari R.A., Pontes A., Rosa F.E., Rainho C.A., Rogatto S.R.: Independent clonal origin of multiple uterine leiomyomas that was determined by X chromosome inactivation and microsatellite analysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2005; 193: 1395–1403
- [21] Catherino W.H., Leppert P.C., Stenmark M.H., Payson M., Potlog-Nahari C., Nieman L.K., Segars J.H.: Reduced dermatopontin expression is a molecular link between uterine leiomyomas and keloids. *Genes Chromosomes Cancer*, 2004; 40: 204–217
- [22] Celeste A.J., Iannazzi J.A., Taylor R.C., Hewick R.M., Rosen V., Wang E.A., Wozney J.M.: Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990; 87: 9843–9847
- [23] Chegini N., Rong H., Dou Q., Kipersztok S., Williams R.S.: Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in human myometrium and leiomyomata and the direct action of GnRH analogs on myometrial smooth muscle cells and interaction with ovarian steroids *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1996; 81: 3215–3221
- [24] Chegini N., Zhao Y., Williams R.S., Flanders K.C.: Human uterine tissues throughout the menstrual cycle expresses transforming growth factor- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), TGF- $\beta 2$ , TGF- $\beta 3$ , and TGF- $\beta$  type 2 receptor messenger ribonucleic acid and protein and contains [125I]TGF- $\beta 1$ -binding sites. *Endocrinology*, 1994; 135: 439–449
- [25] Christiano A.M., Uitto J.: Molecular complexity of the cutaneous basement membrane zone. Revelations from the paradigms of epidermolysis bullosa. *Exp. Dermatol.*, 1996; 5: 1–11
- [26] Colognato H., Yurchenco P.D.: Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev. Dyn.*, 2000; 218: 213–234
- [27] Delaet N.G., Robinson L.A., Wilson D.M., Sullivan R.W., Bradley E.K., Dankwardt S.M., Martin R.L., Van Wart H.E., Walker K.A.: Novel inhibitors of procollagen C-terminal proteinase. Part I: Diamino acid hydroxamates. *Bioorg Med. Chem. Lett.*, 2003; 13: 2101–2104
- [28] Dou Q., Tarnuzzer R.W., Williams R.S., Schultz G.S., Chegini N.: Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in leiomyomata: a mechanism for gonadotropin releasing hormone agonist-induced tumor regression. *Mol. Hum. Reprod.*, 1997; 3: 1005–1014
- [29] Dou Q., Zhao Y., Tarnuzzer R.W., Rong H., Williams R.S., Schultz G.S., Chegini N.: Suppression of TGF- $\beta$ s and TGF- $\beta$  receptors mRNA and protein expression in leiomyomata in women receiving gonadotropin releasing hormone agonist therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1996; 81: 3222–3230
- [30] Ducy P., Karsenty G.: The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int.*, 2000; 57: 2207–2214
- [31] Esqueda A.F., Lee S.J.: Regulation of metanephric kidney development by growth/differentiation factor 11. *Dev. Biol.*, 2003; 257: 356–370
- [32] Fisher L.W., Torchia D.A., Fohr B., Young M.F., Fedarko N.S.: Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001; 280: 460–465
- [33] Gamer L.W., Wolfman N.M., Celeste A.J., Hattersley G., Hewick R., Rosen V.: A novel BMP expressed in developing mouse limb, spinal cord, and tail bud is a potent mesoderm inducer in *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.*, 1999; 208: 222–232
- [34] Garrigue-Antar L., Francois V., Kadler K.E.: Deletion of epidermal growth factor-like domains converts mammalian tolloid into a chordinase and effective procollagen C-proteinase. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 49835–49841
- [35] Garrigue-Antar L., Hartigan N., Kadler K.E.: Post-translational modification of bone morphogenetic protein-1 is required for secretion and stability of the protein. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 43327–43334
- [36] Ge G., Greenspan D.S.: BMP1 controls TGF- $\beta 1$  activation via cleavage of latent TGF- $\beta$ -binding proteins. *J. Cell. Biol.*, 2006; 175: 111–120
- [37] Ge G., Greenspan D.S.: Developmental roles of the BMP1/TLD metalloproteinases. *Birth Defects Res. C. Embryo Today*, 2006; 78: 47–68
- [38] Ge G., Hopkins D.R., Ho W.B., Greenspan D.S.: GDF11 forms a bone morphogenetic protein 1-activated latent complex that can modulate nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.*, 2005; 25: 5846–5858
- [39] Ge G., Seo N.S., Liang X., Höök M., Greenspan D.S.: Bone morphogenetic protein-1/tolloid-related metalloproteinases process osteoglycin and enhance its ability to regulate collagen fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 41626–41633
- [40] Ge G., Zhang Y., Steiglit B.M., Greenspan D.S.: Mammalian tolloid-like 1 binds procollagen C-proteinase enhancer protein 1, and differs from bone morphogenetic protein 1 in the functional role of homologous protein domains. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 10786–10798
- [41] Gonzales E.M., Reed C.C., Bix G., Fu J., Zhang Y., Gopalakrishnan B., Greenspan D.S., Iozzo R.V.: BMP-1/tolloid-like metalloproteinases process edorepellin, the angiostatic C-terminal fragment of perlecan. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 7080–7087
- [42] Gopalakrishnan B., Wang W.M., Greenspan D.S.: Biosynthetic processing of the Pro- $\alpha 1$ (V)Pro- $\alpha 2$ (V)Pro- $\alpha 3$ (V) procollagen heterotrimer. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 30904–30912
- [43] Greenspan D.S.: Biosynthetic processing of collagen molecules. *Top. Curr. Chem.*, 2005; 247: 149–183
- [44] Gross K.L., Panhuysen C.I., Kleinman M.S., Goldhammer H., Jones E.S., Nassery N., Stewart E.A., Morton C.C.: Involvement of fumarate hydratase in nonsyndromic uterine leiomyomas: genetic linkage analysis and FISH studies. *Genes Chromosomes Cancer*, 2004; 41: 183–190
- [45] Harett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. *Handbook of proteolytic enzymes*; Academic Press 2004





- [46] Harmon E.B., Apelqvist A.A., Smart N.G., Gu X., Osborne D.H., Kim S.K.: GDF11 modulates NGN3+ inlet progenitor cell number and promotes  $\beta$ -cell differentiation in pancreas development. *Development*, 2004; 131: 6163–6174
- [47] Hartigan N., Garrigue-Antar L., Kadler K.E.: Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1). Identification of the minimal domain structure for procollagen C-proteinase activity. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 18045–18049
- [48] Hashimoto J., Kariya Y., Miyazaki K.: Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332). *Stem Cells*, 2006; 24: 2346–2354
- [49] Hata R.I., Peterkofsky B.: Specific changes in the collagen phenotype of BALB 3T3 cells as a result of transformation by sarcoma viruses or a chemical carcinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977; 74: 2933–2937
- [50] Hayakawa T., Yamashita K., Ohuchi E., Shinagawa A.: Cell-growth promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J. Cell. Sci.*, 1994; 107: 2373–2379
- [51] Hintze V., Höwel M., Wermter C., Grosse Berkhoff E., Becker-Pauly C., Beermann B., Yiallourou I., Stöcker W.: The interaction of recombinant subdomains of the procollagen C-proteinase with procollagen I provides a quantitative explanation for functional differences between two splice variants, mammalian tolloid and bone morphogenetic protein 1. *Biochemistry*, 2006; 45: 6741–6748
- [52] Hojima Y., van der Rest M., Prockop D.J.: Type I procollagen carboxyl-terminal proteinase from chick embryo tendons. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, 1985; 260: 15996–16003
- [53] Huggins L.G., Lennarz W.J.: Inhibitors of procollagen C-terminal proteinase block gastrulation and spicule elongation in the sea urchin embryo. *Dev. Growth Differ.*, 2001; 43: 415–424
- [54] Hynes R.O.: Alteration of cell-surface proteins by viral transformation and by proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973; 70: 3170–3174
- [55] Ignatz R.A., Massague J.: Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, 1986; 261: 4337–4345
- [56] Iozzo R.V.: Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2005; 6: 646–656
- [57] Janitz M., Heiser V., Böttcher U., Landt O., Lauster R.: Three alternatively spliced variants of the gene coding for the human bone morphogenetic protein-1. *J. Mol. Med.*, 1998; 76: 141–146
- [58] Jasuja R., Ge G., Voss N.G., Lyman-Gingerich J., Branam A.M., Pelegri F.J., Greenspan D.S.: Bone morphogenetic protein 1 prodomain specifically binds and regulates signaling by bone morphogenetic proteins 2 and 4. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 9053–9062
- [59] Kagan H.M., Li W.: Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J. Cell. Biochem.*, 2003; 88: 660–672
- [60] Katayama M., Sekiguchi K.: Laminin-5 in epithelial tumor invasion. *J. Mol. Histol.*, 2004; 35: 277–286
- [61] Kawaguchi K., Fujii S., Konishi I., Nanbu Y., Nonogaki H., Mori T.: Mitotic activity in uterine leiomyomas during the menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1989; 160: 637–641
- [62] Kessler E., Adar R.: Type I procollagen C-proteinase from mouse fibroblasts. Purification and demonstration of a 55-kDa enhancer glycoprotein. *Eur. J. Biochem.*, 1989; 186: 115–121
- [63] Kessler E., Takahara K., Biniaminov L., Brusel M., Greenspan D.S.: Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science*, 1986; 371: 360–362
- [64] Kim J.W., Nam S.H., Jang K.T., Lee S.H., Kim C.C., Hahn S.H., Hu J.C., Simmer J.P.: A novel splice acceptor mutation in the DSPP gene causing dentinogenesis imperfecta type II. *Hum. Genet.*, 2004; 115: 248–254
- [65] Komuro H., Mori M., Hayashi Y., Fukagawa M., Makino S., Takahara K., Greenspan D.S., Momoi M.Y.: Mutational analysis of the BMP-1 gene in patients with gastrochisis. *J. Pediatr. Surg.*, 2001; 36: 885–887
- [66] Laping N.J., Everitt J.I., Frazier K.S., Burgert M., Portis M.J., Cadacio C., Gold L.I., Walker C.L.: Tumor-specific efficacy of transforming growth factor- $\beta$ RI inhibition in Eker rats. *Clin. Cancer Res.*, 2007; 13: 3087–3099
- [67] Larrain J., Oelgeschläger M., Ketpura N.I., Reversade B., Zakin L., De Robertis E.M.: Proteolytic cleavage of chordin as a switch for the dual activities of twisted gastrulation in BMP signalling. *Development*, 2001; 128: 4439–4447
- [68] Lee B.S., Nowak R.A.: Human leiomyoma smooth muscle cells show increased expression of transforming growth factor- $\beta$ 3 (TGFB3) and altered response to the antiproliferative effects of TGF $\beta$ 3. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001; 86: 913–920
- [69] Lee H.X., Ambrosio A.L., Reversade B., De Robertis E.M.: Embryonic dorsal-ventral signalling: secreted frizzled-related proteins as inhibitors of tolloid proteinases. *Cell*, 2006; 124: 147–159
- [70] Lee S., Solow-Cordero D.E., Kessler E., Takahara K., Greenspan D.S.: Transforming growth factor- $\beta$  regulation of bone morphogenetic protein-1/procollagen C-proteinase and related proteins in fibrogenic cells and keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 19059–19066
- [71] Lee S.J. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2004; 20: 61–86
- [72] Lee S.J., McPherron A.C.: Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 9306–9311
- [73] Leighton M., Kadler K.E.: Paired basic furin-like proprotein convertase cleavage of pro-BMP-1 in the trans-Golgi network. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 18478–18484
- [74] Leppert P.C., Catherino W.H., Segars J.H.: A new hypothesis about the origin of uterine fibroids based on gene expression profiling with microarrays. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2006; 195: 415–420
- [75] Levi E., Fridman R., Miao H.Q., Ma Y.S., Yayon A., Vlodavsky I.: Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 7069–7074
- [76] Li S.W., Sieron A.L., Fertala A., Hojima Y., Arnold W.V., Prockop D.J.: The C-proteinase that processes procollagen to fibrillar collagens is identical to the protein previously identified as bone morphogenetic protein-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 1996; 93: 5127–5130
- [77] Ligon A.H., Morton C.C.: Genetics of uterine leiomyoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000; 28: 235–245
- [78] Liu X., Zhao Y., Gao J., Pawlyk B., Starcher B., Spencer J.A., Yanagisawa H., Zuo J., Li T.: Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat. Genet.*, 2004; 36: 178–182
- [79] Lobel M.K., Somasundaram P., Morton C.C.: The genetic heterogeneity of uterine leiomyomata. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.*, 2006; 33: 13–39
- [80] Luo X., Ding L., Xu J., Chegini N.: Gene expression profiling of leiomyoma and myometrial smooth muscle cells in response to transforming growth factor- $\beta$ . *Endocrinology*, 2007; 146: 1097–1118
- [81] Ma C., Chegini N.: Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors in human myometrial smooth muscle cells by TGF- $\beta$ 1. *Mol. Hum. Reprod.*, 1999; 5: 950–954
- [82] Marqués G., Musacchio S., Shimell M.J., Wünnenberg-Stapleton K., Cho K.W., O'Connor M.B.: Production of a DPP activity gradient in the early *Drosophila* embryo through the opposing actions of the SOG and TLD proteins. *Cell*, 1997; 91: 417–426
- [83] Massague J.: TGF- $\beta$  signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, 1998; 67: 753–791
- [84] Massague J., Seoane J., Wotton D.: Smad transcription factors. *Genes Dev.*, 2005; 19: 2783–2810
- [85] McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J.: Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11. *Nat. Genet.*, 1999; 22: 260–264
- [86] Medeck R.J., Sosa S., Morris N., Oxford J.T.: BMP-1 mediated proteolytic processing of a alternatively spliced isoforms of collagen type XI. *Biochem. J.*, 2003; 376: 361–368
- [87] Moali C., Font B., Ruggiero F., Eichenberger D., Rousselle P., François V., Oldberg A., Bruckner-Tuderman L., Hulmes D.J.: Substrate-specific modulation of a multisubstrate proteinase. C-terminal processing of fibryllar procollagen is the only BMP-1 activity to be enhanced by PCPE-1. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 24188–24194
- [88] Molnar J., Fong K.S., He Q.P., Hayashi K., Kim Y., Fong S.F., Fogelgren B., Szauter K.M., Mink M., Csiszar K.: Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1647: 220–224
- [89] Mongiat M., Sweeney S.M., San Antonio J.D., Fu J., Iozzo R.V.: Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 4238–4249
- [90] Mott J.D., Thomas C.L., Rosenbach M.T., Takahara K., Greenspan D.S., Banda M.J.: Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer releases a metalloproteinase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 1384–1390



- [91] Nunes I., Gleizes P.E., Metz C.N., Rifkin D.B.: Latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor- $\beta$ . *J. Cell. Biol.*, 1997; 136: 1151–1163
- [92] Oelgeschläger M., Larrañ J., Geissert D., De Robertis E.M.: The evolutionary conserved BMP-binding protein twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature*, 2000; 405: 757–763
- [93] Panchenko M.V., Stetler-Stevenson W.G., Trubetskoy O.V., Gacheru S.N., Kagan H.M.: Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolyl oxidase. Potential role of procollagen C-proteinase. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 7113–7119
- [94] 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
- [95] Piccolo S., Agius E., Lu B., Goodman S., Dale L., De Robertis E.M.: Cleavage of chordin by xolloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Spemann organizer activity. *Cell*, 1997; 91: 407–416
- [96] Placzek M., Yamada T., Tessier-Lavigne M., Jessell T., Dodd J.: Control of dorsoventral pattern in vertebrate neural development: induction and polarizing properties of the floor plate. *Development*, 1991; Suppl 2: 105–122
- [97] Polito P., Dal Cin P., Kazmierczak B., Rogalla P., Bullerdiek J., Van den Berghe H.: Deletion of HMGI7 in uterine leiomyoma with ring chromosome 1. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1999; 108: 107–109
- [98] Prockop D.J., Hulmes D.J.: Assembly of collagen fibrils de novo from soluble precursors: polymerization and copolymerization of procollagen, pN-collagen, and mutated collagens. *Extracellular matrix assembly and structure*. San Diego, CA: Academic Press, 1994; 47–90
- [99] Prockop D.J., Kivirikko K.I.: Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.*, 1995; 64: 403–434
- [100] Qin C., Baba O., Butler W.T.: Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, 2004; 15: 126–136
- [101] Rattenholl A., Pappano W.N., Koch M., Keene D.R., Kadler K.E., Sasaki T., Timpl R., Burgeson R.E., Greenspan D.S., Bruckner-Tuderman L.: Proteinases of the bone morphogenetic protein-1 family convert procollagen VII to mature anchoring fibril collagen. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 26372–26378
- [102] Reeves R.: Molecular biology of HMG A proteins: hubs of nuclear function. *Gene*, 2001; 277: 63–81
- [103] Rein M.S., Barbieri R.L., Friedman A.J.: Progesterone: a critical role in the pathogenesis of uterine myomas. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1995; 172: 14–18
- [104] Ricard-Blum S., Bernocco S., Font B., Moali C., Eichenberger D., Farjanel J., Burchardt E.R., van der Rest M., Kessler E., Hulmes D.J.: Interaction properties of the procollagen C-proteinase enhanced protein shed light on the mechanism of stimulation of BMP-1. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 33864–33869
- [105] Robinson L.A., Wilson D.M., Delaet N.G.: Novel inhibitors of procollagen C-terminal proteinase. Part 2: glutamic acid hydroxamates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003; 13: 2381–2384
- [106] Sargent M.S., Weremowicz S., Rein M.S., Morton C.C.: Translocation in q22 define a critical region in uterine leiomyomata. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1994; 77: 65–68
- [107] Scott I.C., Blitz L.L., Pappano W.N., Imamura Y., Clark T.G., Steiglit B.M., Thomas C.L., Maas S.A., Takahara K., Cho K.W., Greenspan D.S.: Mammalian BMP-1/tolloid-related metalloproteinases, including novel family member mammalian tolloid-like 2, have differential enzymatic activities and distributions of expression relevant to patterning and skeletogenesis. *Dev. Biol.*, 1999; 213: 283–300
- [108] Scott I.C., Clark T.G., Takahara K., Hoffman G.G., Greenspan D.S.: Structural organization and expression patterns of the human and mouse genes for the type I procollagen COOH-terminal proteinase enhancer protein. *Genomics*, 1999; 55: 229–234
- [109] Sieron A.L., Trietiakowa A., Jameson B.A., Segall M.L., Lund-Katz S., Khan M.T., Li S., Stöcker W.: Structure and function of procollagen C-proteinase (mTolloid) domains determined by protease digestion, circular dichroism, binding to procollagen type I, and computer modelling. *Biochemistry*, 2000; 39: 3231–3239
- [110] Smith-Mungo L.I., Kagan H.M.: Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol.*, 1998; 16: 387–398
- [111] Sozen I., Arici A.: Interaction of cytokines, growth factors, and the extracellular matrix in the cellular biology of uterine leiomyomata. *Fertil. Steril.*, 2002; 78: 1–12
- [112] Sozen I., Kovanci E., Arici A.: Bidirectional effect of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and stimulatory effect of platelet-derived growth factor (pDF) on mitogenesis of human myometrial and leiomyoma cells. *Fertil. Steril.*, 2000; 74: S246–S247
- [113] St Croix B., Rago C., Velculescu V., Traverso G., Romans K.E., Montgomery E., Lal A., Riggins G.J., Lengauer C., Vogelstein B., Kinzler K.W.: Gene expressed in human tumor endothelium. *Science*, 2000; 289: 1197–1202
- [114] Steiglit B.M., Ayala M., Narayanan K., George A., Greenspan D.S.: Bone morphogenetic protein-1/tolloid-like proteinases process dentin matrix protein-1. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 980–986
- [115] Steiglit B.M., Keene D.R., Greenspan D.S.: PCOLCE2 encodes a functional procollagen C-proteinase enhancer (PCPE2) that is a collagen-binding protein differing in distribution of expression and post-translational modification from previously described PCPE1. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 49820–49830
- [116] Steiglit B.M., Kreider J.M., Frankenburg E.P., Pappano W.N., Hoffman G.G., Meganck J.A., Liang X., Höök M., Birk D.E., Goldstein S.A., Greenspan D.S.: Procollagen C-proteinase enhancer 1 genes are important determinants of the mechanical properties and geometry of bone and the ultrastructure of connective tissues. *Mol. Cell. Biol.*, 2006; 26: 238–249
- [117] Stewart E.A., Friedman A.J., Peck K., Nowak R.A.: Relative overexpression of collagen type I and collagen type III messenger ribonucleic acids by uterine leiomyomas during the proliferative phase of menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 1994; 79: 900–906
- [118] Stewart E.A., Morton C.C.: The genetics of uterine leiomyomata: what clinicians need to know. *Obstet. Gynecol.*, 2006; 107: 917–921
- [119] Sullivan M.W., Guzik D.S.: The natural history of uterine myomas. *Infertil. Reprod. Med. Clin. North Am.*, 1996; 7: 1–4
- [120] Suzuki N., Labosky P.A., Furuta Y., Hargett L., Dunn R., Fogo A.B., Takahara K., Peters D.M., Greenspan D.S., Hogan B.L.: Failure of central body wall closure in Morse embryos lacking a procollagen C-proteinase encoded by Bmp1, a mammalian gene related to *Drosophila* tolloid. *Development*, 1996; 122: 3587–3595
- [121] Takahara K., Brevard R., Hoffman G.G., Suzuki N., Greenspan D.S.: Characterization of a novel gene product (mammalian tolloid-like) with high sequence similarity to mammalian tolloid/bone morphogenetic protein-1. *Genomics*, 1996; 34: 157–165
- [122] Takahara K., Kessler E., Biniaminov L., Brusel M., Eddy R.L., Jani-Sait S., Shows T.B., Greenspan D.S.: Type I procollagen COOH-terminal proteinase enhancer protein: identification, primary structure, and chromosomal localization of the cognate human gene (PCOLCE). *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 26280–26285
- [123] Takahara K., Lyons G.E., Greenspan D.S.: Bone morphogenetic protein-1 and mammalian tolloid homologue (mTLD) are encoded by alternatively spliced transcripts which are differentially expressed in some tissues. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 32572–32578
- [124] Terranova V.P., Rohrbach D.H., Martin G.R.: Role of laminin in the attachments of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen. *Cell*, 1980; 22: 719–726
- [125] Trackman P.C., Bedell-Hogan D., Tang J., Kagan H.M.: Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 8666–8671
- [126] Uzel M.I., Scott I.C., Babakanlou-Chase H., Palamakumbura A.H., Pappano W.N., Hong H.H., Greenspan D.S., Trackman P.C.: Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase that correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 22537–22543
- [127] Veitch D.P., Nokelainen P., McGowan K.A., Nguyen T.T., Nguyen N.E., Stephenson R., Pappano W.N., Keene D.R., Spong S.M., Greenspan D.S., Findell P.R., Marinkovich M.P.: Mammalian tolloid metalloproteinase, and not matrix metalloprotease 2 or membrane type 1 metalloprotease, process laminin-5 in keranocytes and skin. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 15661–15668
- [128] Vikhlyeva E.M., Khodzhaeva Z.S., Fantschenko N.D.: Familial predisposition to uterine leiomyomas. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 1995; 51: 127–131
- [129] Wolanska M., Sobolewski K., Drozdewicz M., Bankowski E.: Extracellular matrix components in uterine leiomyoma and their alteration during the tumour growth. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1998; 189: 145–152



- [130] Wolfman N.M., McPherron A.C., Pappano W.N., Davies M.V., Song K., Tomkinson K.N., Wright J.F., Zhao L., Sebald S.M., Greenspan D.S., Lee S.J.: Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100:15842–15846
- [131] Wozney J.M., Rosen V., Celeste A.J., Mitsock L.M., Whitters M.J., Kriz R.W., Hewick R.M., Wang E.A.: Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 1988; 242: 1528–1534
- [132] Wu H.H., Ivkovic S., Murray R.C., Jaramillo S., Lyons K.M., Johnson J.E., Calof A.L.: Autoregulation of neurogenesis by GDF11. *Neuron*, 2003; 37: 197–207
- [133] Xing Y., Powell W.L., Morton C.C.: The del(7q) subgroup in uterine leiomyomata: Genetic and biologic characteristic. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1997; 98: 69–74
- [134] Zacchigna L., Vecchione C., Notte A., Cordenonsi M., Dupont S., Maretto S., Cifelli G., Ferrari A., Maffei A., Fabbro C., Braghetta P., Marino G., Selvetella G., Aretini A., Colonnese C., Bettarini U., Russo G., Soligo S., Adorno M., Bonaldo P., Volpin D., Piccolo S., Lembo G., Bressan G.M.: *Emilin 1* links TGF- $\beta$  maturation to blood pressure homeostasis. *Cell*, 2006; 124: 929–942
- [135] Zhang Y., Ge G., Greenspan D.S.: Inhibition of bone morphogenetic protein 1 by native and altered forms of  $\alpha 2$ -macroglobulin. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 39096–39104
- [136] Zhou J., Mochizuki T., Smeets H., Antignac C., Laurila P., de Paepe A., Tryggvason K., Reeders S.T.: Deletion of the paired  $\alpha 5(IV)$  and  $\alpha 6(IV)$  collagen genes in inherited smooth muscle tumors. *Science*, 1993; 261: 1167–1169