

# Zmiany mRNA wariantów alternatywnego składowania C-endopeptydazy prokolagenu w mięśniakach macicy w zależności od fazy cyklu miesięcznego i u kobiet w okresie klimakterium

Changes of mRNAs encoding alternatively spliced variants of procollagen C-endopeptidase in leiomyomas uteri depending on the phase of menstrual cycle and in postmenopausal women

Auguściak-Duma Aleksandra<sup>1,4</sup>, Kajor Maciej<sup>2</sup>, Piwowarczyk Magdalena<sup>3</sup>, Sikora Jerzy<sup>3</sup>, Sieron Aleksander L.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Zakład Biologii Ogólnej Molekularnej i Genetyki, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach;

<sup>2</sup> Katedra Morfologii, Zakład Histopatologii, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach;

<sup>3</sup> Klinika Ginekologii i Położnictwa, Centralny Szpital Kliniczny, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

<sup>4</sup> Centrum Doskonałości Badania i Nauczania Biologii Molekularnej Macierzy i Nanotechnologii, Sieć CD BioMedTech „Silesia”

## Streszczenie

**Wstęp:** Mięśniak gładkokomórkowy macicy (*Leiomyoma uteri*) jest niezłośliwym nowotworem monoklonalnym błony mięśniowej macicy. Rozwój guza charakteryzuje nadmierny i nieprawidłowy rozrost macierzy pozakomórkowej. Główne składniki macierzy pozakomórkowej to kolageny typu I i III. Odcięcie C-propeptydów w prokolagenach typu I, II i III przez C-endopeptydazę prokolagenu wzbudza samoistne składowanie włókien kolagenowych. Endopeptydaza jest kluczowym regulatorem wytwarzania macierzy pozakomórkowej, kontroli jej jakości oraz procesów rozwojowych, takich jak rozwój kości czy naczyń krwionośnych.

**Cel pracy:** Celem pracy jest analiza syntezy trzech wariantów mRNA powstających w wyniku alternatywnego składowania transkryptów genu *BMP1*, kodującego C-endopeptydazę prokolagenu, w mięśniakach macicy, w porównaniu do prawidłowej błony mięśniowej macicy u kobiet w I i II fazie cyklu miesięcznego oraz w klimakterium.

**Materiał i Metody:** W badaniach analizowano materiał pochodzący z leiomyoma uteri i tkanek kontrolnych uzyskanych od 52 pacjentek. Proces alternatywnego składowania wariantów mRNA genu *BMP1* był oznaczany metodą densytometryczną produktów otrzymanych z reakcji RT-PCR. Znamienność statystyczną wykrytych różnic sprawdzano testami ANOVA i Najmniejszych Istotnych Różnic (LSD) w programie *mSTATC* oraz testem *t-Studenta* dla  $p \leq 0,05$ .

## Adres do korespondencji:

Aleksander L. Sieron  
Katedra i Zakład Biologii Ogólnej Molekularnej i Genetyki,  
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,  
ul. Medyków 18, Bud. C-1, 40-752 Katowice,  
Tel.: +48-32-2088394, Faks: +48-32-2088382,  
e-mail: alsieron@sum.edu.pl

Otrzymano: 15.09.2008  
Zaakceptowano do druku: 15.12.2008

Auguściak-Duma A, et al.

**Wyniki:** Analiza produktów RT-PCR ujawniła obecność mRNA trzech wariantów alternatywnego składowania transkryptu genu BMP1 oraz zmiany w natężeniu alternatywnego składowania wariantów zależnie od fazy cyklu menstruacyjnego lub klimakterium. W drugiej fazie cyklu, w tkance kontrolnej spadało nasilenie ekspresji wariantu BMP-1 w porównaniu do fazy pierwszej i klimakterium. Natomiast w guzie, u kobiet w okresie klimakterium, w porównaniu z kobietami w drugiej fazie cyklu zaobserwowano nasilenie ekspresji wariantu BMP-1. Poszukiwanie wariantu mTLD w tkance guzowej u kobiet w drugiej fazie cyklu i w klimakterium, z kobietami w pierwszej fazie cyklu ujawniło jego zanikanie, podczas gdy w tkance kontrolnej nie obserwowano takiej zmiany. Obecność wariantu BMP-1/HIS była najsilniej zaznaczona, w tkance kontrolnej w drugiej fazie cyklu i klimakterium, a w tkance guzowej słabiej zaznaczyła się jego obecność w drugiej fazie cyklu.

**Wnioski:** Regulacja alternatywnego składowania wariantów C-endopeptydazy prokolagenu w guzach leiomyoma uteri i błonie mięśniowej macicy zależy, przede wszystkim od fazy cyklu miesięcznego.

Słowa kluczowe: **kolagen / macierz pozakomórkowa / mięśniaki macicy / C-endopeptydaza prokolagenu /**

## Summary

*Leiomyoma uteri is a monoclonal tumour of the uterus muscle layer. It is characterized by excessive, abnormal growth of extracellular matrix. The collagen types I and III are the major components of extracellular matrix. Removal of the C-propeptides in procollagens type I, II, and III by procollagen C-endopeptidase leads to spontaneous self-assembly of collagen fibrils. Thus, the procollagen C-endopeptidase is a key regulator of extracellular matrix production, its quality, and other developmental processes including angiogenesis.*

**Objective:** The objective of this study was to analyze the three alternatively spliced variants of the BMP1 gene product including the procollagen C-endopeptidase, in leiomyoma uteri tumors in comparison to normal myometrium in women being in first or second menstrual phase or in time of climacterium.

**Material and Methods:** In the study we analyzed samples from the control and cancerous tissues from 52 women. Expression of the three alternatively spliced variants of BMP1 gene transcript were assayed by RT-PCR, following densitometric analysis. Statistical significance ( $p \leq 0,05$ ) of the observed differences was assessed with the use of Anova test, Least Significance Different Test, and Student's T-test.

**Results:** Analysis of RT-PCR products revealed the presence of all alternatively spliced variants of BMP-1 mRNA and the changes in their alternative splicing intensity, depending on the phase of menstrual cycle or postmenopausal state. In the second phase of the cycle, in control tissue, the expression level of BMP-1 variant decreased when compared to women in I phase of the cycle or postmenopausal women. In the tumour, postmenopausal women showed increased expression of BMP-1at, when compared with women in the second phase of the cycle. The presence of mTLD in the tumour tissue at II phase of the cycle and in postmenopausal state was less strong when compared to women at I phase of the cycle. In control tissue this type of change was not observed. The BMP-1/HIS was present at higher level in control tissue, during II phase of the menstrual cycle and in postmenopausal state, whereas in the tumour tissue its lowest level was at II phase of the cycle.

**Conclusions:** Regulation of alternative splicing of mRNA for procollagen C-endopeptidase in leiomyomas and myometrium depends mainly on the hormonal status of women.

Key words: **collagen / extracellular matrix / leiomyoma / procollagen C-endopeptidase /**

## Wstęp

Mięśniak gładkokomórkowy macicy (*leiomyoma uteri*), to niezłośliwy nowotwór zawierający komórki mięśni gładkich i zręb włóknistej tkanki łącznej. Częstość występowania tego guza szacuje się na prawie 77% u kobiet w wieku rozrodczym. Średnio dwie trzecie z nich ma wiele guzów, różnych rozmiarów, umiejscowionych śródściennie, podśluzówkowo lub podsurowicówkowo [1, 2].

Cechą charakterystyczną morfologiczną *leiomyoma* jest nagromadzenie włókninowych składników macierzy pozakomórkowej (*extracellular matrix* – ECM) [3]. Przeprowadzone mapowanie ekspresji genów za pomocą mikromacierzy cDNA ujawniły podstawowe geny, których ekspresja w guzach leiomyoma uteri jest rozregulowana. Są to geny kodujące produkcję kolagenów, proteoglikany i elastynę, czyli białka

związane z produkcją macierzy pozakomórkowej oraz geny, których produkty regulują syntezę i jakość macierzy, takie jak TGF- $\beta$ 1 i 3 [4]. Stąd, powstawanie i rozrost mięśniaków macicy jest wiązany z zaburzeniem regulacji ekspresji genów kodujących białka macierzy pozakomórkowej i jej czynników regulatorowych.

C-endopeptydaza prokolagenu jest cynko-zależną metaloproteinazą z rodziny astacyn [5]. Proteinazy te są obecne w tkankach różnorodnych organizmów, od jamochłonów do człowieka. Ich funkcje są niejednorodne i obejmują procesy od trawienia polipeptydów, do obróbki białek macierzy i aktywacji czynników wzrostowych [6]. C-endopeptydaza prokolagenu jest kodowana przez gen BMP1, którego produkt podlega alternatywnemu składowaniu do, co najmniej trzech wariantów splajsingowych.

## Zmiany mRNA wariantów alternatywnego składania C-endopeptydazy prokolagenu w mięśniakach macicy...

Najlepiej poznany z nich to BMP-1, drugim jest najdłuższy znany wariant – mTLD (*mammalian Tolloid*) podobny do białka wykrytego u *Drosophila*, zwanego TLD (*Tolloid*). Trzecim wariantem jest BMP-1/HIS, wyizolowany tylko w postaci mRNA z łożyska. Warianty te charakteryzuje fizjologiczna i tkankowa swoistość [7].

### Cel pracy

Głównym celem badań była analiza występowania trzech wariantów alternatywnego składania mRNA powstających po transkrypcji genu BMP1 w mięśniakach macicy w I i II fazie cyklu miesięcznego oraz w okresie klimakterium.

### Materiał i metody

Do badań wykorzystano tkanki mięśniaków macicy pobrane od 52 kobiet w różnych fazach cyklu miesięcznego lub w okresie klimakterium. Na badania uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej nr NN-6501-212/04 oraz świadomą zgodę pacjentek.

W momencie operacji 17 kobiet było w pierwszej fazie cyklu, 17 w drugiej fazie, a 15 w okresie klimakterium. 24 kobiety podały, że w najbliższej rodzinie występowały mięśniaki rodzinne, 28 kobiet nie stwierdziło takiego faktu. Jako pacjentki w okresie klimakterium uznano te z nich, które miały ostatnią miesiączkę co najmniej 6 miesięcy przed datą operacji.

W czasie zabiegu operacyjnego, do badania wybrano jeden, największy, rozpoznany makroskopowo mięśniak.

Wycinki tkanek do badań molekularnych pobierali anatomicy, bezpośrednio po rutynowym pobraniu materiału do badań histopatologicznych. Pobierano również fragmenty mięśnia macicy bez obecności mięśniaków, które traktowano jako tkankę kontrolną. Próbkę po pobraniu natychmiast umieszczano w buforze RNeasy (Qiagen), a następnie zamrażano w temperaturze -20°C. Tkanek były oceniane niezależnie przez dwóch histopatologów.

Do badań używano całkowitego, oczyszczonego mRNA z mięśniaków oraz tkanek stanowiących kontrolę. mRNA otrzymywano przy pomocy zestawu do izolacji mRNA – RNeasy Mini Kit firmy Qiagen (Niemcy) według procedury zalecanej przez producenta zestawu. Oczyszczony mRNA służył jako matryca w reakcji odwrotnej transkrypcji, której produkt poddawano łańcuchowej reakcji polimerazowej. Startery zaprojektowano indywidualnie przy pomocy programu komputerowego Primer-Select w pakiecie oprogramowania DNA-Star (LaserGene).

Wszystkie startery do wariantów genu BMP1 zakupiono w firmie IDT (Coralville, IA, USA). (Tabela I). Startery do wykrywania ludzkiej  $\beta$ -aktyny zakupiono w firmie Genosys (Niemcy).

### Izolacja RNA

Całkowity mRNA oczyszczano z tkanek po ich homogenizacji w buforze RLT (bufor lizujący RNA) znajdującym się w zestawie RNeasy Mini Kit (Qiagen). Stężenie mRNA oznaczano spektrofotometrycznie i 200ng całkowitego mRNA z każdej tkanki używano do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-PCR).

### Startery do amplifikacji swoistych odcinków DNA

Do zaprojektowania starterów wykorzystywano sekwencje cDNA zdeponowane w GenBank NCBI o numerach dostępu: U50330 dla mTLD, NM\_001199 dla BMP-1, NM\_006128 dla BMP-1/HIS oraz NM\_001101 dla  $\beta$ -aktyny ludzkiej. Użyte do namnażania odcinków startery pozwalają na jednoznaczne rozróżnienie wariantów mRNA, co zostało potwierdzone sekwencjonowaniem otrzymanych w ich obecności produktów PCR. Sekwencję analizowano po PCR sekwencyjnym przy pomocy analizatora DNA ABI PRISM 310.

W części próbek, na matrycy mRNA otrzymanego, zarówno z tkanek prawidłowych, jak i guzowych, obok oczekiwanego produktu pojawiały się w niewielkiej ilości, dodatkowe produkty o nieoczekiwanej długości i sekwencjach nieobecnych w trzech badanych wariantach. Próba kompensacji, po uwzględnieniu różnic  $T_m$  powstających produktów PCR, nie dała zadowalających wyników.

Reakcje odwrotnej transkrypcji (RT-PCR) wykonano dwuetapowo, z użyciem starterów oligo-dT oraz AMV Enhanced Reverse Transcriptase (Sigma). Reakcję PCR przeprowadzano przy użyciu polimerazy JumpStart AccuTaq LA DNA Polymerase (Sigma). W celu określenia liczby cykli reakcji PCR z maksimum przyrostu logarytmicznego przeprowadzono porównanie produktów reakcji z  $\beta$ -aktyną ludzką. Uzyskane wyniki wskazały na możliwość wykonywania 35 cykli reakcji PCR i uzyskania powtarzalnej ilości produktu dla maksimum przyrostu logarytmicznego (Dane nie pokazane). Wszystkie produkty PCR analizowano po rozdziale w 1,2% żelu agarozowym.

### Analiza produktów RT-PCR

Wcześniejsze doniesienia Janitza i wsp. [8] pokazały obecność, co najmniej trzech innych produktów składania pierwotnego transkryptu genu BMP1, o nieznanach dotychczas funkcjach biologicznych. Aby uniknąć oznaczeń nieswoistych produktów zdecydowano się na oznaczanie tylko produktów

**Tabela I.** Wykaz starterów reakcji PCR wykorzystywanych do otrzymywania wybranych unikalnych odcinków wariantów genu BMP1 i  $\beta$ -aktyny oraz ich pozycja w cDNA.

Starter	Starter F	Starter R
BMP-1 348 pz	gCAGTTTgACTTCTTTgAgACAgA 1922-1945	AAggTgAggTCCTgAgTAACAAg 2269-2246
mTLD 593 pz	TATgACTACATgAgCTCTTCgAC 2755-2778	gTgggAAATgAACATTACAATgAA 3347-3324
BMP-1/HIS 249 pz	gTCTTggAgggggCAGgggACCgA 2136-2159	TCCCCTCCTggggggCCAgAgTCA 2385-2362
$\beta$ -aktyna 603 pz	gTggggCgCCCCAgCACCA 176-195	CTCCTTAATgTCACgCACgATTTC 715-692

Auguściak-Duma A, et al.

alternatywnego składowania o znanych funkcjach biologicznych, a więc BMP-1, mTLD i BMP-1/HIS. W tym celu wykonano analizę densytometryczną prążków odpowiadających długością odcinkom DNA otrzymanym po RT-PCR, w których wykryto wyłącznie oczekiwaną sekwencję DNA odpowiedniego wariantu. Oznaczenia gęstości prążków wykonywano przy pomocy programów Kodak 1D oraz Image Quant Solutions wersja 1.2 (IQ v1.2) (Molecular Dynamics). Wykorzystując znaną ilość DNA w prążkach odpowiadających wzorcom długości DNA możliwe było oznaczenie ilości DNA w prążkach odpowiadającym odcinkom otrzymanym w reakcji PCR. Program IQ mierzy intensywność prążków przez zliczanie pikseli w analizowanym prążku po odjęciu liczby pikseli w zmierzonym w ten sam sposób tle.

Do analizy różnych fragmentów mRNA, ilość otrzymanego DNA była normalizowana na podstawie gęstości pikseli prążków wzorcowych ilości DNA odpowiadających długością analizowanym fragmentom DNA. (Rycina 1). Marker długości DNA będący mieszaniną 1µg DNA bakteriofaga φX174 pociętego endonukleazą restrykcyjną HindIII (Finnzyme) jest także markerem ilości DNA – w danych prążkach zawiera ściśle określoną ilość DNA.

Dla produktu odpowiadającego BMP-1 mierzono liczbę pikseli fragmentu wzorcowego o długości 310 p.z. (zawierającego 29ng DNA), dla mTLD i β-aktyny prążka wzorcowego o długości 603 p.z. (56ng DNA), (rycina 1 – dolny panel),

a dla BMP-1/HIS prążka wzorcowego o długości 284 p.z. (26ng DNA). Zawartość DNA w badanych prążkach odpowiadających sekwencjom w trzech badanych wariantach mRNA przedstawiono jako krotność prążka wzorcowego o odpowiedniej długości.

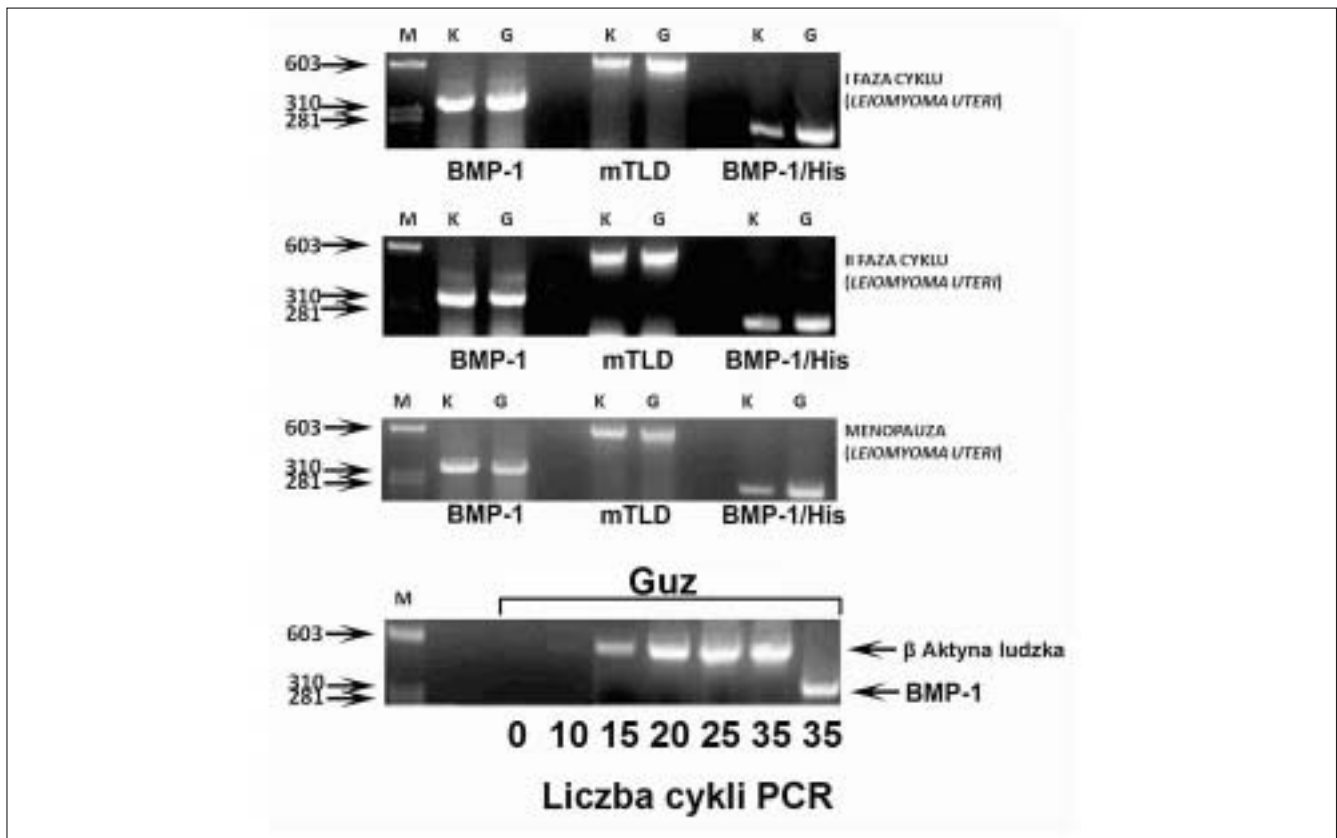
**Analiza statystyczna.**

Analizę statystyczną wyników wykonano z wykorzystaniem programu mSTATC, testami ANOVA oraz LSD (*Least Significance Difference Test*) dla  $p \leq 0,05$ , a znamienność statystyczną obserwowanych różnic sprawdzano przy pomocy testu t-Studenta.

**Wyniki**

Analiza produktów RT-PCR w postaci prążków po rozdiale w żelu agarozowym ujawniła obecność trzech odcinków o oczekiwanej długości, odpowiednio: 348, 593 oraz 249 pz. (Rycina 1).

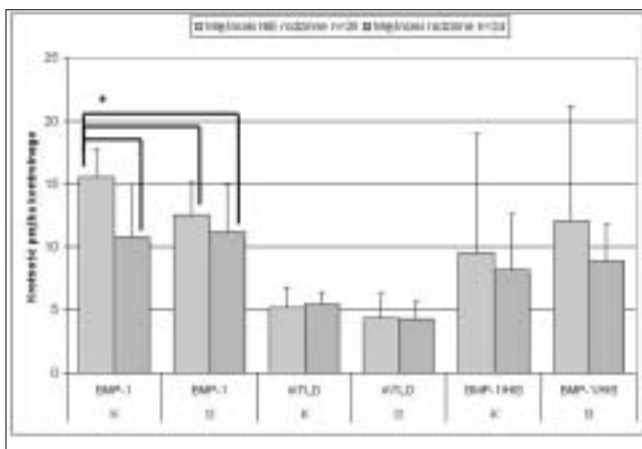
Analiza statystyczna zawartości względnej badanych wariantów, w zależności od występowania wśród najbliższych krewnych (matka, siostra, babcia, siostra matki), zachorowań na *leiomyoma uteri* ujawniła znamiennej statystycznie niższą ( $p \leq 0,05$ ) zawartość mRNA dla BMP-1 w tkance kontrolnej pacjentek z postacią rodzinną włókniakomięśniaka macicy, w porównaniu do pacjentek bez rodzinnych epizodów tego schorzenia. (Rycina 2).



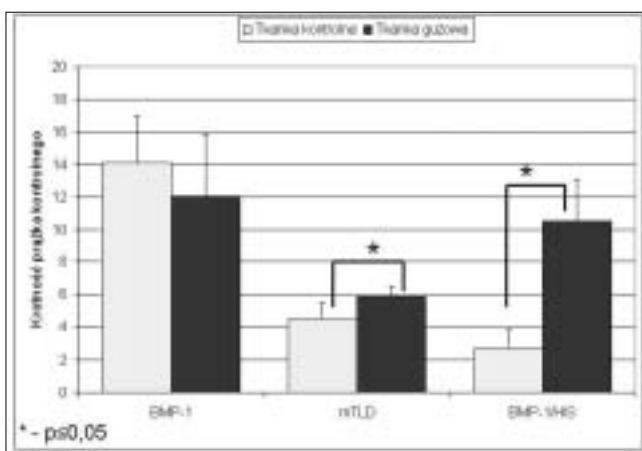
**Rycina 1.** Wizualizacja produktów PCR przy użyciu mRNA kodujących warianty C-endopeptydazy prokolagenu w próbkach pobranych od pacjentek ze zdiagnozowanym guzem leiomyoma uteri w różnych fazach cyklu menstruacyjnego oraz w okresie klimakterium. Prążki odpowiadające produktom PCR namnożonym w obecności wyizolowanego mRNA z tkanek kontrolnych (K) i guzowych (G). Prążki na ścieżkach oznaczonych literą M zawierają wzorec długości i ilości DNA o podanej długości wyrażonej liczbą pz. Dolny panel przedstawia reprezentatywne wyniki rozdzielania elektroforetycznego produktów reakcji PCR wykonanej w obecności starterów o sekwencjach unikalnych w cDNA ludzkiej β-aktyny.



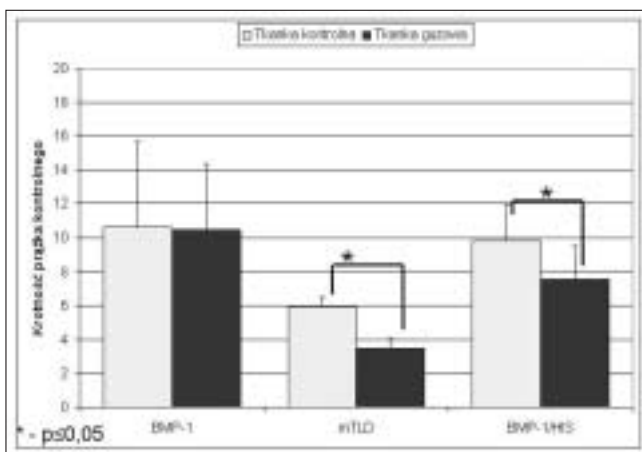
Zmiany mRNA wariantów alternatywnego składania C-endopeptydazy prokolagenu w mięśniakach macicy...



**Rycina 2.** Zależność mRNA wariantów C-endopeptydazy prokolagenu od występowania mięśniaków w postaci rodzinnej lub nie, u badanych pacjentek.



**Rycina 3.** Porównanie mRNA wariantów C-endopeptydazy prokolagenu w tkance kontrolnej i guzowej w I fazie cyklu miesięcznego.



**Rycina 4.** Porównanie mRNA wariantów C-endopeptydazy prokolagenu w tkance kontrolnej i guzowej w II fazie cyklu miesięcznego.

Wyniki badania 49 kobiet cierpiących na mięśniaki gładkokomórkowe macicy wskazują na to, że synteza wariantów alternatywnego składania C-endopeptydazy prokolagenu zależy od fazy cyklu menstruacyjnego. Analiza statystyczna różnic względnej gęstości prążków, odpowiadających długością odcinkom DNA z wariantów mTLD i BMP-1/HIS ujawniła, że ekspresja mRNA była istotnie statystycznie wyższa, odpowiednio 0,3- i 4-krotnie ( $p \leq 0,05$ ), w tkance guzowej kobiet w pierwszej fazie cyklu menstruacyjnego w porównaniu do tkanki kontrolnej. (Rycina 3).

Wykazano także znamienne statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) niższą o 41% i 23% ekspresję, odpowiednio mRNA wariantów mTLD i BMP-1/HIS w tkankach guzowych w drugiej fazie cyklu miesięcznego w porównaniu do tkanki prawidłowej. (Rycina 4).

U kobiet w klimakterium, wykryto natomiast znamienne statystycznie, niższą o 41% ekspresję mRNA dla mTLD ( $p \leq 0,05$ ) w tkance kontrolnej w porównaniu do tkanki guzowej. (Rycina 5).

Ekspresja mRNA wariantów BMP-1 i BMP-1/HIS w tkance kontrolnej różniła się bardzo wyraźnie zależnie od fazy cyklu menstruacyjnego. (Rycina 6A).

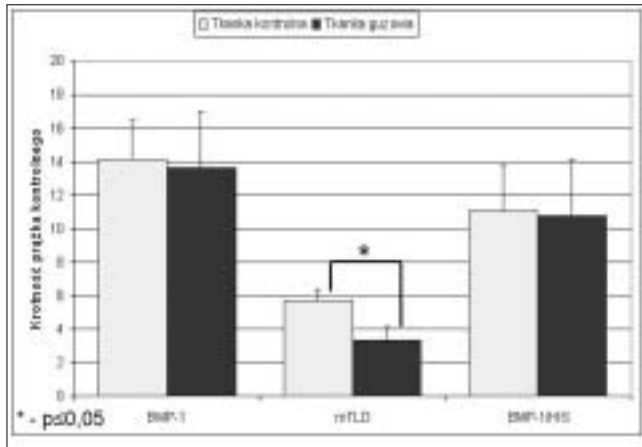
Ekspresja mRNA wariantu BMP-1 była niższa o 25% w drugiej fazie cyklu ( $p \leq 0,05$ ) w porównaniu do pierwszej fazy i o 25% wyższa ( $p \leq 0,05$ ) u kobiet w klimakterium w porównaniu do kobiet, od których materiał do badania pobrano w drugiej fazie cyklu. Dla mRNA wariantu mTLD nie zaobserwowano znamienych statystycznie różnic intensywności odpowiadających im prążków zależnie od fazy cyklu. Ekspresja mRNA wariantu BMP-1/HIS wzrastała 3,5-krotnie w drugiej fazie cyklu menstruacyjnego i 4-krotnie w klimakterium w sposób znamienne statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) w porównaniu do pierwszej fazy cyklu.

Ekspresja mRNA wszystkich trzech wariantów w tkance guzowej różniła się znacząco w zależności od fazy cyklu menstruacyjnego. (Rycina 6B). Dla mRNA wariantu BMP-1 zaobserwowano znamienne statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) różnice w jego zawartości pomiędzy kobietami w drugiej fazie cyklu, a znajdującymi się w okresie postmenopauzalnym.

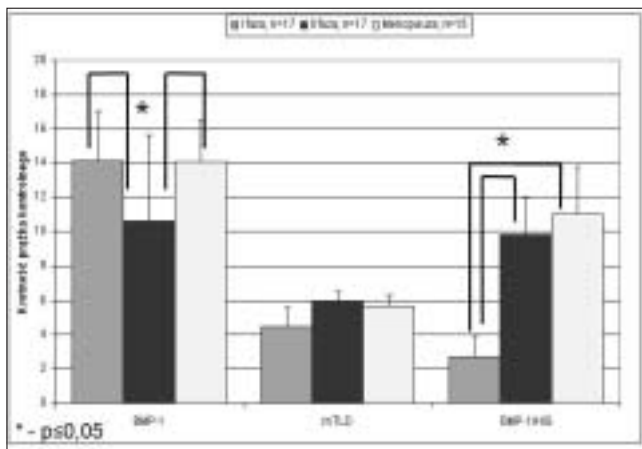
W porównaniu z drugą fazą cyklu zaobserwowano znamienne statystycznie wzrost ( $p \leq 0,05$ ) ekspresji mRNA wariantu BMP-1 zależnie od fazy cyklu lub klimakterium. Ekspresję mRNA wariantu mTLD cechował natomiast spadek w fazie drugiej cyklu oraz w klimakterium w porównaniu z fazą pierwszą o odpowiednio 41% i 43% ( $p \leq 0,05$ ). Natomiast różnice w ekspresji mRNA wariantu BMP-1/HIS wykazywały znamienne statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) spadek o 38% i 42% w drugiej fazie cyklu w odniesieniu odpowiednio do pierwszej fazy cyklu i kobiet postmenopauzalnych.

## Dyskusja

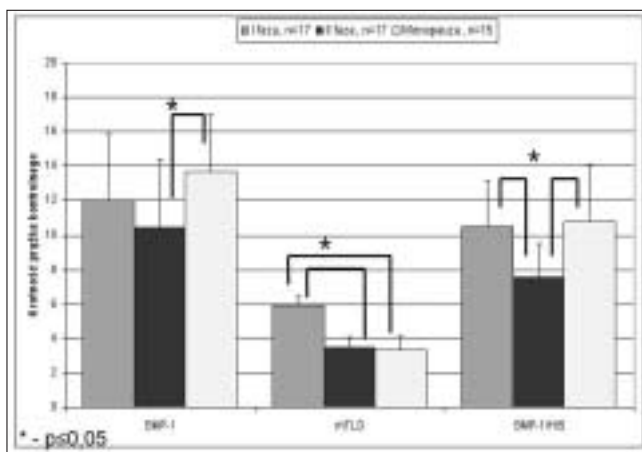
Mięśniak gładkokomórkowy macicy jest najczęstszym wskazaniem do usunięcia macicy [9]. Obecnie nie ma skutecznej farmakoterapii tych guzów. W farmakoterapii najczęściej stosuje się analogi gonadoliberyny. Wyniki leczenia są na ogół niezadowolające. Agoniści GnRH poza regresją guza, powodują demineralizację kości, dlatego nie można ich stosować dłużej niż 6 miesięcy. Po zaprzestaniu zażywania leku, guzy powracają do stanu przed rozpoczęciem leczenia [10].



Rycina 5. Porównanie mRNA wariantów C-endopeptydazy prokolagenu w tkance kontrolnej i guzowej w menopauzie.



Rycina 6A. Zmiany mRNA wariantów C-endopeptydazy prokolagenu w kolejnych fazach cyklu miesięcznego w tkance kontrolnej.



Rycina 6B. Zmiany mRNA wariantów C-endopeptydazy prokolagenu w kolejnych fazach cyklu miesięcznego w tkance guzowej (B).

W niniejszej pracy wykryto mRNA wariantu BMP-1/HIS poza łożyskiem oraz wykazano, że ekspresja mRNA wariantów alternatywnego składowania produktów genu BMP1 jest wrażliwa na zmiany hormonalne w cyklu miesięcznym kobiety.

Powszechnie wiadomo, że produkty alternatywnego składowania BMP1 odpowiadają za aktywność C-proteazową prokolagenów *in vivo*, a usunięcie C-propeptydu jest wymagane do fibrylogenezy kolagenowej [11]. Dlatego białka BMP-1/mTLD/BMP-1/HIS są atrakcyjnym celem dla potencjalnych leków w sytuacjach, gdy zahamowanie fibrylogenezy kolagenu jest pożądane, tak jak w *leiomyoma uteri*.

W każdym analizowanym mięśniaku macicy stwierdzono występowanie mRNA wszystkich trzech badanych wariantów C-endopeptydazy prokolagenu. Takahara i wsp. [7] wykryli mRNA dwóch wariantów, BMP-1 i mTLD, we wszystkich dojrzałych tkankach ludzkiego organizmu, poza macicą której wówczas nie badali, a mRNA wariantu BMP-1/HIS wykryli tylko w łożysku [7]. Rozbieżności, między wynikami Takahary i wsp. oraz wynikami niniejszych badań, tłumaczymy różnicą metodyczną polegającą na tym, że mRNA wariantów BMP-1, Takahara i wsp. wykrywali metodą Northern Blot, która jest mniej czuła niż użyta w niniejszych badaniach metoda RT-PCR.

Obecność mRNA wariantów alternatywnego składowania produktu genu BMP1 w prawidłowych tkankach błony mięśniowej macicy oraz w guzach *leiomyoma uteri* może być świadectwem przemian macierzy pozakomórkowej analogicznych do intensywnej przebudowy macierzy łożyska. W tkance guzowej kobiet będących w pierwszej fazie cyklu menstruacyjnego stwierdzono czterokrotny wzrost stężenia mRNA wariantu BMP-1/HIS w porównaniu do tkanki prawidłowej, co może wskazywać na intensywne przekształcanie prokolagenu do kolagenu [12]. Nie wiadomo jednak, jaką funkcję w zdrowym organizmie pełni ten wariant. Może to być rola regulująca aktywność pozostałych wariantów i dlatego zachwianie równowagi stężeń trzech wariantów BMP-1 może prowadzić do błędnej obróbki prokolagenu i innych ich substratów.

Brak różnic między tkanką kontrolną i guzową w trakcie cyklu miesięcznego dla wariantu BMP-1, może świadczyć, że jego produkcja nie zależy od zachodzących w guzie zmian nowotworowych. Spadek natężenia ekspresji mRNA wariantu BMP-1 w tkance kontrolnej w II fazie cyklu miesięcznego w stosunku do I fazy, jest odwrotny niż zmiany stężenia TGF- $\beta$ 1, który jest uważany za bezpośredni regulator syntezy BMP-1 [13].

W okresie postmenopauzalnym synteza tego wariantu jest zbliżona do jego ekspresji w I fazie cyklu [14]. W guzie zależność stężenia mRNA BMP-1 od fazy cyklu jest podobna, chociaż spadek jego ekspresji w II fazie nie jest znamieny statystycznie w porównaniu do I fazy. Możliwe, że niezależnie od zjawisk nowotworowych, mRNA BMP-1 podlega alternatywnemu składowaniu, gdyż jest potrzebny w tkance macicy do jej bieżącego funkcjonowania. Pod wpływem progesteronu w II fazie cyklu alternatywne składowanie mRNA wariantu BMP-1 jest mniejsze, pomimo wysokiego stężenia TGF- $\beta$ 1. Zmiany w stężeniu mRNA tego wariantu mogą więc świadczyć o jego zależności od stężenia estrogenów.

## Zmiany mRNA wariantów alternatywnego składania C-endopeptydazy prokolagenu w mięśniakach macicy...

Natężenie alternatywnego składania mRNA wariantu BMP-1 w tkance kontrolnej kobiet bez rodzinnego występowania mięśniaków jest wyższe, niż u kobiet z obciążonym wywiadem oraz w tkance guzowej. Brak różnic między alternatywnym składaniem mRNA wariantu BMP-1 w tkance kontrolnej i guzowej u kobiet z mięśniakami występującymi w ich rodzinach wskazuje na bardziej złożoną regulację alternatywnego składania pierwotnego transkryptu genu BMP-1.

Produkcja wariantów mRNA kodujących mTLD i BMP-1/HIS jest silniej zróżnicowana zależnie od tkanki i fazy cyklu miesięcznego. Profil ten dla mRNA mTLD w tkance prawidłowej może wskazywać na to, że synteza mTLD jest mniej podatna na zmiany hormonalne, jednak w tkance guzowej pojawia się jej zależność od stężenia estrogenów. Liczba receptorów estrogenowych na powierzchni komórek jest zwykle wyższa w tkance guzowej [15]. Przy niższym stężeniu estrogenów w II fazie i menopauzie obniża się również produkcja mRNA wariantu mTLD. W warunkach fizjologicznych stężenie estrogenów może nie mieć wpływu na alternatywne składanie mRNA dla mTLD, ale w warunkach patologicznych, gdy nadmiar receptorów zwiększa ilość sygnałów indukowanych przez ten hormon, może on powodować wzrost natężenia składania mRNA mTLD w I fazie cyklu oraz nadwrażliwość składania na estrogeny. Gdy brak jest estrogenów, w II fazie cyklu obniża się ekspresja mRNA wariantu mTLD, nawet poniżej stężenia fizjologicznego, podobnie jak ma to miejsce w menopauzie.

Najbardziej zróżnicowany profil składania ekspresji mRNA charakteryzuje wariant BMP-1/HIS. Może to świadczyć o największej wrażliwości mechanizmu jego składania na wahania hormonów w cyklu miesięcznym oraz na zmiany ekspresji czynników wzrostu, ich receptorów na powierzchni komórek guzowych lub innych czynników regulatorowych. W warunkach fizjologicznych stężenie mRNA kodującego wariant BMP-1/HIS wskazuje na hamowanie, pod wpływem estrogenów, składania jego mRNA. W II fazie cyklu oraz w menopauzie, gdy brak jest tego hormonu, ekspresja mRNA kodującego BMP-1/HIS jest 3 do 4-krotnie wyższa niż w I fazie cyklu. Niestety obserwacja profilu składania w tkance guzowej zdaje się temu przeczyć, gdyż w obecności wyższego stężenia estrogenów w I fazie cyklu (nadmiar receptorów estrogenowych) powstawanie tego wariantu nie tylko nie ulega silniejszemu zahamowaniu ale jego synteza jest 4-krotnie większa, podobnie jak to obserwowano w menopauzie [15].

Ekspresja mRNA wariantu BMP-1/HIS w tkance guzowej wskazuje na spadek jego stężenia w obecności progesteronu. Można więc zaproponować wytłumaczenie, że ekspresja mRNA dla wariantu BMP-1/HIS jest regulowana w sposób złożony i prawdopodobnie bez bezpośredniego związku z działaniem hormonów, a tylko przypadkowo koreluje ona z cyklem hormonalnym. Innym wytłumaczeniem może być to, że ekspresja mRNA wariantu BMP-1/HIS może wiązać się ze zmianą równowagi stężeń mRNA pozostałych wariantów C-endopeptydazy prokolagenu, lub jakiegoś innego nieznanego czynnika regulatorowego. Nie można też wykluczyć, że wariant ten steruje składaniem mRNA wariantów BMP-1 i mTLD przez, na przykład blokowanie składania ich mRNA lub niedopuszczanie do jego translacji.

Próby hamowania ekspresji TGF- $\beta$ 1 wykazały, że chociaż blokowanie aktywności tego czynnika zmniejsza częstość powstawania guzów oraz ogranicza ich wielkość, to jednak prowokuje rozwój guzów nowotworowych w tkance nabłonkowej [16]. BMP-1 może więc być lepszym celem terapeutycznym, gdyż działa swoiściej, bezpośrednio na tworzenie włókien kolagenu, a pośrednio na aktywność TGF- $\beta$ 1. Lesiak i wsp. [17] wykazali możliwość hamowania aktywności C-proteazowej wariantu mTLD przy pomocy syntetycznego, 6-aminokwasowego oligopeptydu o sekwencji, konserwatywnej ewolucyjnie w chordynie, białku które jest naturalnym blokerem aktywności czynników morfogenetycznych z nadrodziny TGF- $\beta$ , a mianowicie BMP-2 i BMP-4 [18, 19].

Udział wariantów składania pierwotnego transkryptu genu BMP-1 w różnorodnych i pozornie niezwiązanych z sobą procesach fizjologicznych, wymaga jednak bardzo rozważnego zastosowania blokerów ich aktywności enzymatycznej, tak aby nie doprowadzić do rozchwiania delikatnej równowagi pomiędzy dynamicznymi procesami biologicznymi, zachodzącymi w macierzach pozakomórkowych wszystkich tkanek organizmu.

## Wnioski

Regulacja alternatywnego składania mRNA C-endopeptydazy prokolagenu w guzach leiomyoma uteri i błonie mięśniowej macicy jest zależna od fazy cyklu miesięcznego. W drugiej fazie cyklu słabiej zaznaczona jest obecność BMP-1 w tkance kontrolnej, w porównaniu do fazy pierwszej i klimakterium. Natomiast w guzie, u kobiet w okresie klimakterium, nasilała się obecność tego wariantu. Obecność wariantu mTLD w tkance guzowej u kobiet w drugiej fazie cyklu i w klimakterium była mniej widoczna w porównaniu do kobiet w pierwszej fazie cyklu. Obecność trzeciego, badanego w niniejszej pracy, wariantu BMP-1/HIS była najsilniej widoczna, w tkance kontrolnej, w drugiej fazie cyklu i klimakterium, natomiast w tkance guzowej jego obecność była słabiej widoczna w drugiej fazie cyklu.

Alternatywne składanie produktu genu BMP-1 może mieć również związek z genetycznymi skłonnościami do guzów *leiomyoma uteri*.

Wzrost ekspresji poszczególnych wariantów alternatywnego składania genu BMP1 w guzach *leiomyoma uteri* w porównaniu do prawidłowej tkanki wskazuje na ich związki z rozrostem tkanki nowotworowej oraz funkcją BMP-1/HIS w regulacji ekspresji i/lub oddziaływania pozostałych wariantów alternatywnego składania mRNA C-endopeptydazy prokolagenu.

## Podziękowania:

*Praca naukowa finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych w latach 2003 do 2006, jako projekt badawczy 3 P05D 037 23 oraz środków statutowych Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach nr umowy NN-1-008/03.*

## Piśmiennictwo

1. Canevari R, Pontes A, Rosa F, [et al.]. 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.
2. Al-Hendy A, Salama S. Gene therapy and uterine leiomyoma: a review. *Human Reprod Update.* 2006, 12, 385-400.
3. Sullivan M, Guzick D. The natural history of uterine myomas. *Infertil Reprod Med Clin North Am.* 1996, 7, 1-4.
4. Leppert P, Catherino W, Segars J. A new hypothesis about the origin of uterine fibroids based on gene expression profiling with microarrays. *Am J Obstet Gynecol.* 2006, 195, 415-420.
5. Barrett A, Rawlings N, Woessner J. Handbook of proteolytic enzymes. *Amsterdam: Academic Press, 2004, Second Edition.*
6. Auguściak-Duma A, Sieroń A. Molekularna charakterystyka guzów leiomyoma uteri na przykładzie wybranych składników macierzy pozakomórkowej. *Postępy Hig Med Dosw.* 2008, 62, 148-165.
7. Takahara K, Lyons G, Greenspan D. 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.
8. Janitz M, Heiser V, Böttcher U, [et al.]. Three alternatively spliced variants of the gene coding for the human bone morphogenetic protein-1. *J Mol Med.* 1998, 76, 141-146.
9. Stewart E, Morton C. The genetics of uterine leiomyomata: what clinicians need to know. *Obstet Gynecol.* 2006, 107, 917-921.
10. Farquahar C, Arroll B, Ekeroma A, [et al.]. An evidence-based guideline for the management of uterine fibroids. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2001, 41, 125-140. Tłumaczenie i uaktualnienie (18.04.2008) ze strony portalu *Medycyna Praktyczna*. <http://www.mp.pl/artykuly/?aid=11891>
11. Prockop D, Sieron L, Li W. Procollagen N-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that are essential for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling. *Matrix Biol.* 1998, 16, 399-408.
12. Stewart E, Friedman AJ, Peck K, [et al.]. 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 Metab.* 1994, 79, 900-906.
13. Lee S, Solow-Cordero D, Kessler E, [et al.]. 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.
14. Ding L, Xu J, Luo X, [et al.]. Gonadotropin releasing hormone and transforming growth factor beta activate mitogen-activated protein kinase/extracellularly regulated kinase and differentially regulate fibronectin, type I collagen, and plasminogen activator inhibitor-1 expression in leiomyoma and myometrial smooth muscle cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, 89, 5549-5557.
15. Rein M, Barbieri R, Friedman A. Progesterone: a critical role in the pathogenesis of uterine myomas. *Am J Obstet Gynecol.* 1995, 170, 1623-1628.
16. Laping N, Everitt J, Frazier K, [et al.]. Tumor-specific efficacy of transforming growth factor-BetaRI inhibition in eker rats. *Clin Cancer Res.* 2007, 13, 3087-3099.
17. Lesiak M, Auguściak-Duma A, Szydło A, [et al.]. Specific inhibitor of procollagen C-endopeptidase activity by synthetic peptide with conservative sequence fund in Chordin. *Acta Bioch Pol.* 2008, 55, 297-305.
18. Piccolo S, Agius E, Lu B, [et al.]. Cleavage of Chordin by Xolloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Spemann organizer activity. *Cell.* 1997, 91, 407-416.
19. Jasuja R, Ge G, Voss N, [et al.]. Bone morphogenetic protein 1 prodomain specifically binds and regulates signaling by bone morphogenetic proteins 2 and 4. *J Biol Chem.* 2007, 282, 9053-9062.