

## **Zaburzenia kaskady transformujących czynników wzrostu typu $\beta$ w wybranych patologiach człowieka**

Aberrations in the signalling cascade of transforming growth factor  $\beta$  type in selected human pathologies

PIOTR K. ZAKRZEWSKI

Katedra Cytobiochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Łódzki

### **Streszczenie**

Kaskada sygnalizacyjna transformujących czynników wzrostu typu  $\beta$  (TGF $\beta$ ) stanowi indukowany przez wiele cytokin szlak przekazywania sygnału w komórce, pod kontrolą którego znajduje się szereg procesów komórkowych odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie ludzkiego organizmu. Znaczenie zaburzeń sygnalizacji indukowanej czynnikami TGF $\beta$  pozostaje nadal nie do końca poznane. Niemniej jednak już na obecnym etapie badań stwierdzić można ich bezsprzeczny udział w patologiach układu kostno-mięśniowego, układu krwionośnego czy układu rozrodczego.

**Słowa kluczowe:** transformujące czynniki wzrostu typu  $\beta$  - TGF $\beta$ , sygnalizacja komórkowa, patofizjologia, polimorfizm, mutacje.

### **Abstract**

A transforming growth factor  $\beta$  type (TGF $\beta$ ) cascade is a multifactorial signalling pathway, which controls the plethora of cellular processes responsible for human organism homeostasis. The importance of alterations of TGF $\beta$ -induced signalling remains unknown. Up till now, impaired TGF $\beta$  signalling has been observed in pathologies of the musculoskeletal, cardiovascular and reproductive systems. Abnormalities in the TGF $\beta$  pathway can be either genetically determined or appear as spontaneous disorders which emerged during embryonic development. Understanding the role of the TGF $\beta$

---

**Adres do korespondencji:** Piotr Zakrzewski; Katedra Cytobiochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki 90-236 Łódź, ul. Pomorska 141/143, tel.: 42 635-52-99, fax.: 42 635-44-84, e-mail: pkzak@biol.uni.lodz.pl

pathway in the aetiology of various diseases appears to be necessary as it may serve in developing new strategies for therapeutic or diagnostic methods.

**Key words:** transforming growth factor  $\beta$  type - TGF $\beta$ , cellular signalling, pathophysiology, polymorphism, mutations.

## Wstęp

Różnorodność funkcji i procesów komórkowych jest następstwem udziału wysoce specyficznych szlaków sygnalizacyjnych, dzięki aktywności których sygnał pochodzący z zewnątrz komórki, zostaje przekazany do jej wnętrza, czego konsekwencją jest regulacja transkrypcji określonych genów. Inicjacja sygnalizacji komórkowej zwykle następuje pod wpływem interakcji ligandów obecnych w macierzy zewnątrzkomórkowej ze specyficznymi receptorami, będącymi nieodzownymi elementami błony komórkowej. Przekazywanie tak zainicjowanego sygnału następuje często dzięki aktywności kinazowej (tyrozynowej lub serynowo/treoninowej) domeny cytoplazmatycznej receptorów. Funkcja receptorów może być modulowana przez dodatkowe białka błonowe pełniące rolę receptorów pomocniczych (ang. *accessory receptors*, *auxilliary receptors*, *co-receptors*), których głównym zadaniem jest prezentowanie ligandów ich specyficznym receptorom. Przykładem szlaku sygnalizacyjnego inicjowanego ligandami obecnymi w macierzy zewnątrzkomórkowej jest szlak transformujących czynników wzrostu typu  $\beta$  (TGF $\beta$ , ang. *transforming growth factor  $\beta$* ). W szlaku tym przekazywanie sygnału następuje dzięki aktywności kinazowej serynowo/treoninowej specyficznych transbłonowych receptorów. Aktywność tych receptorów dodatkowo modulowana jest przez transbłonowe lub zakotwiczone na

powierzchni błony białka, odpowiedzialne za prezentowanie ligandów receptorom dla transformujących czynników wzrostu typu  $\beta$ .

Tabela 1. Zaburzenia kaskady TGF $\beta$  w wybranych patologiach człowieka.

| <b>Choroba</b>   | <b>Komponent szlaku TGF<math>\beta</math></b> | <b>Zaburzenie</b>   |
|--|---|---------------------|
| <b>Układ kostno-mięśniowy</b>  |   |                     |
| Zespół Camuratiiego-Engelmana  | TGF $\beta$ 1                                 | wzrost ekspresji    |
| Postępujące kostniejące zapalenie-mięśni (FOP)                                 | ALK2  | mutacja aktywująca  |
|  | ALK3  | wzrost ekspresji    |
|  | BMP-4   | wzrost ekspresji    |
| Chondrodysplazja typu Grebego (CGT), chondrodysplazja Huntera-Thompsona (CHTT) | GDF-5   | utrata funkcji      |
| Brachodaktylia typu A2 (BDA2)  | ALK6  | utrata funkcji      |
| Zrosty kostne stawów śródrečno-paliczkowych                                    | GDF-5   | mutacja aktywująca  |
| Osteoporoza  | TGF $\beta$ 1                                 | wzrost ekspresji    |
| Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD)   | GDF-8   | mutacja aktywująca  |
| <b>Układ naczyniowy</b>  |   |                     |
| Wrodzona naczyniakowatość krwotoczna (HHT), zespół Rendu-Oslera-Webera         | endoglina (CD105)                             | utrata funkcji      |
|  | ALK1  | utrata funkcji      |
| <b>Układ rozrodczy</b>   |   |                     |
| Zespół przetrwałych przewodów Müllera (PMDS)                                   | MIS/AMH                                       | obniżenie ekspresji |
|  | MISRII/AMHRII                                 | utrata funkcji      |
| Pierwotna niewydolność jajników (POF)  | BMP-15  | utrata funkcji      |
|  | inhibina A                                    | utrata funkcji      |

Różnorodność transformujących czynników wzrostu typu  $\beta$  pociąga za sobą mnogość procesów fizjologicznych regulowanych przez te czynniki. Zaburzenia przekazywania sygnału w kaskadzie TGF $\beta$  są przyczyną wielu chorób człowieka zarówno dziedzicznych, jak i pozbawionych komponenty genetycznej. Do chorób tych należą nieprawidłowości w układzie kostno-mięśniowym oraz tkanki łącznej, choroby układu krwionośnego, nieprawidłowości budowy i funkcji układu rozrodczego będące przyczyną bezpłodności, jak również zaburzeń rozwojowych (Tabela. 1).

### **Kaskada TGF $\beta$**

Rodzina transformujących czynników wzrostu typu  $\beta$  to liczna grupa ewolucyjnie zakonserwowanych (utrwalonych) białek, których cytokinowa aktywność wykazuje plejotropowy efekt w wielu fizjologicznych i patologicznych procesach. Do rodziny TGF $\beta$  zalicza się oprócz trzech izoform TGF $\beta$ , tj. TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3, które to uznawane są za białka prototypowe, ponad 30 polipeptydów takich jak: aktywiny A i B (ang. *activins*), inhibiny A i B (ang. *inhibins*), białka morfogenetyczne kości 1-20 (BMP, ang. *bone morphogenetic proteins*), czynniki wzrostu i różnicowania (GDF, ang. *growth differentiation factors*), np. miostatyna, czynniki determinujące asymetrię lewo-prawo, tj. nodal i lefty 1 i 2, oraz MIS/AMH (ang. *Müllerian-inhibiting substance/anti-Müllerian hormone*) [1-3]. Na podstawie podobieństwa w obrębie ich sekwencji aminokwasowej, jak i rodzaju szlaku sygnalizacyjnego, który może zostać indukowany ich aktywnością, wspomniane czynniki podzielone zostały na dwie podrodziny – TGF $\beta$ /aktywiny/nodal/lefty/miostatyna oraz BMP/GDF/MIS [4-7]. Cechą wspólną wszystkich czynników należących do rodziny TGF $\beta$  jest siedem ewolucyjnie zakonserwowanych reszt

cysteinowych tworzących strukturę rdzeniową (ang. *cysteine knot*) [8]. Ligandy te funkcjonujące w formie dimerów syntetyzowane są w formie prekursorowego pre-probiałka. Aktywną formę TGF $\beta$  stanowią dimery o masie cząsteczkowej 25 kDa. W tak złożonym homodimerze, obie podjednostki polipeptydów połączone są ze sobą wiązaniami disiarczkowymi, a całość struktury stabilizowana jest oddziaływaniami hydrofobowymi. Prekursor TGF $\beta$  w wyniku działania proteaz pozbawiony zostaje peptydu sygnałowego o długości 112 reszt aminokwasowych od strony C-końca, czemu towarzyszy uwolnienie dojrzałej formy białka. Postać dojrzała białka pozostaje związana w sposób niekowalencyjny z N-końcowym fragmentem probiałka (LAP, ang. *latency-associated peptide*). Kompleks formy dojrzałej oraz białka LAP tworzy dimer nazywany małym kompleksem latentnym (SLC, ang. *small latency complex*). SLC łącząc się następnie z białkiem LTBP (ang. *latent TGF $\beta$  binding protein*) formuje tzw. duży kompleks latentny (LLC, ang. *large latent complex*). LTBP ze względu na swoją strukturę, oddziałuje z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*), a tym samym odpowiedzialny jest za magazynowanie TGF $\beta$  w ECM do momentu jego aktywacji [8-10]. Wydzielone do macierzy zewnątrzkomórkowej latentne formy czynnika TGF $\beta$  podlegają różnorodnym procesom, prowadzącym do ich aktywacji [11], tak aby mogły oddziaływać ze specyficznymi receptorami błonowymi o aktywności kinaz serynowo/treoninowych. W obrębie receptorów dla czynników TGF $\beta$  wyróżnić można dwie podstawowe grupy, tj. receptory typu I oraz typu II. Podział ten został dokonany na podstawie właściwości strukturalnych obu typów receptorów. Receptory typu I cechuje obecność w ich strukturze aminokwasowej regionu regulatorowego bogatego w reszty glicyny i seryny (ang. *GS region*), ulokowanego powyżej domeny kinazowej [12]. W komórkach człowieka

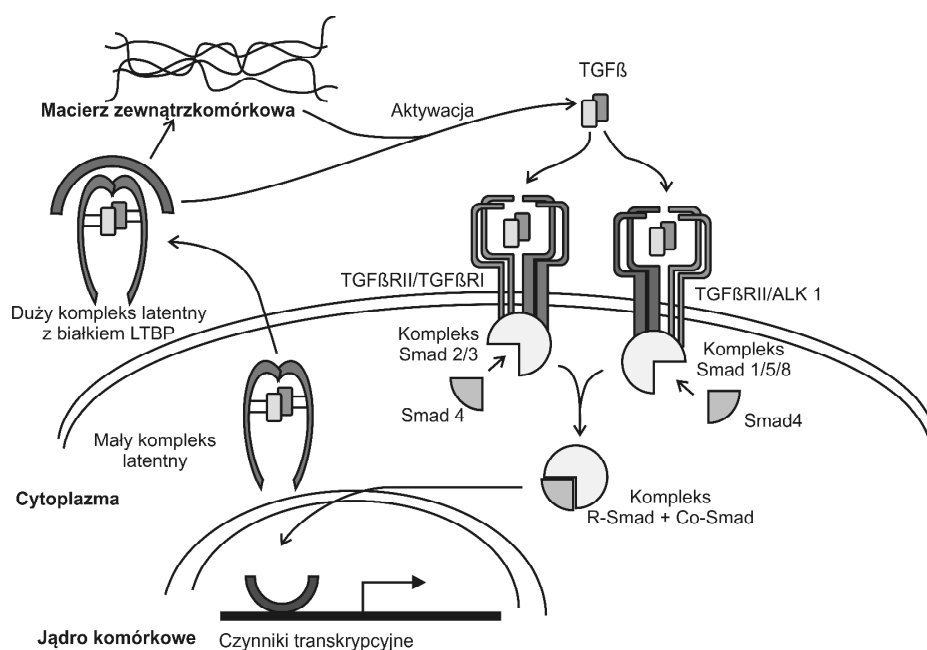
zidentyfikowano siedem receptorów typu I, które określa się wspólnym mianem ALK (ang. *activin receptor-like kinases*), z jednoczesnym wskazaniem numeru od 1 do 7 dla odpowiedniego receptora. Natomiast w przypadku receptorów typu II zidentyfikowano pięć białek, tj. ActRII, ActRIIB (ang. *activin receptor*), BMPRII (ang. *BMP receptor*), MISRII/AMHRII (ang. *Müllerian-inhibiting substance receptor/anti-Müllerian hormone receptor*) oraz TGF $\beta$ RII (ang. *TGF $\beta$  receptor II*) [9]. Ligandy mogą wiązać się zarówno z receptorem typu I jak i typu II w sposób niezależny lub jak ma to miejsce w przypadku izoform TGF $\beta$ , w pierwszej kolejności powstaje kompleks ligand-receptor typu II, do którego następnie przyłączany jest receptor typu I. W przypadku braku ligandów w macierzy zewnątrzkomórkowej receptor typu II może ulegać homodimeryzacji, jak również heterooligomeryzacji z podjednostkami receptora typu I [13]. Niektóre czynniki z rodziny TGF $\beta$  oddziałują z więcej niż jednym receptorem typu II, co skutkuje interakcją powstałego kompleksu z różnymi receptorami typu I (Tabela 2). Aktywowane receptory typu I i II przekazują sygnał wewnątrzkomórkowym mediatorom, tj. białkom z rodziny Smad (ang. *similar to mother against + mother against decapentaplegic*) [14]. Pierwszymi zidentyfikowanymi białkami będącymi homologami białek z rodziny Smad, występującymi u kręgowców, były odkryte u *Drosophila melanogaster* białko Mad (ang. *mother against decapentaplegic*) oraz trzy białka występujące u *Caenorhabditis elegans*: Sma-2, Sma-3 oraz Sma-4 (ang. *similar to mother against*). Białka Smad kręgowców podzielone zostały na trzy podklasy ze względu na pełnione przez nie w komórce funkcje: receptorowe Smad – R-Smad (ang. *receptor-activated Smad*), inhibitorowe Smad – I-Smad (ang. *inhibitory Smad*) oraz pośredniczące Smad – Co-Smad (ang. *common-mediators Smad*). Aktywacja białek R-Smad, do których należą Smad1, Smad2, Smad3, Smad5

i Smad8 następuje w wyniku fosforylacji przez receptory TGF $\beta$  typu I. Białka Smad1, Smad5 i Smad8 są efektorami sygnalizacji inicjowanej BMP, natomiast Smad2 i Smad3 zaangażowane są w przekazywanie sygnału pochodzącego od czynników TGF $\beta$ /aktywiny/nodal.

Tabela 2. Receptory i ich ligandy w kaskadzie TGF $\beta$ .

| Nazwa receptora               | Ligandy  |
|-------------------------------|--|
| <b>Receptory typu I</b>       |  |
| ALK1                          | aktywina A, BMP-9, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 3  |
| ALK2                          | aktywina A, BMP-6, BMP-7, MIS/AMH, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3               |
| ALK3 (BMPRIA)                 | BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7   |
| ALK4                          | aktywina A, GDF-1, GDF-11, nodal   |
| ALK5 (TGF $\beta$ RI)         | TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3  |
| ALK6 (BMPRI B)                | BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, GDF-5, GDF-6, GDF-9b, MIS/AMH                                    |
| ALK7                          | nodal  |
| <b>Receptory typu II</b>      |  |
| ActRII                        | aktywina A, BMP-2, BMP-6, BMP-7, GDF-1, GDF-5, GDF-8, GDF-9b, GDF-11, inhibina A, inhibina B |
| ActRIIB                       | aktywina A, BMP-2, BMP-6, BMP-7, GDF-5, GDF-8, GDF-11, inhibina A, inhibina B, nodal         |
| BMPRII                        | BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, GDF-5, GDF-6, GDF-9b   |
| MISRII/AMHRII                 | MIS/AMH  |
| TGF $\beta$ RII               | TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3  |
| <b>Receptory pomocnicze</b>   |  |
| BETAGLIKAN (TGF $\beta$ RIII) | BMP-2, BMP-4, BMP-7, GDF-5, inhibina, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3            |
| ENDOGLINA (CD105)             | aktywina A, BMP-2, BMP-7, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 3                                       |
| CD109                         | TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 3   |

Aktywowane białka R-Smad tworzą wraz białkiem Smad4 (Co-Smad) heteromeryczne kompleksy, które po translokacji do jądra komórkowego modulują w sposób bezpośredni lub w kompleksach z innymi czynnikami transkrypcyjnymi ekspresję genów docelowych (Ryc. 1) [15, 16].



Ryc. 1. Przekazywanie sygnału w kaskadzie TGF $\beta$ .

Badania nad mechanizmem przekazywania sygnału indukowanego czynnikami TGF $\beta$  pozwoliły stwierdzić, że oprócz udziału receptorów typu I i typu II, ważną rolę odgrywają inne białka zlokalizowane na powierzchni błony komórkowej. W literaturze określane są one jako receptory pomocnicze (ang. *auxiliary, accessory receptors*) lub receptory typu III. Receptory pomocnicze są białkami transbłonowymi lub zakotwiczonymi w błonie komórkowej za



pośrednictwem glikolipidów. W swej strukturze posiadają silnie rozbudowaną domenę zewnątrzkomórkową, zdolną do wiązania ligandów, lecz pozbawione są domeny funkcjonalnej o aktywności enzymatycznej. Główną ich funkcją jest modulowanie siły sygnału poprzez tworzenie z ligandami kompleksów oraz prezentowanie ich stosownym receptorom. Ze względu na brak aktywności enzymatycznej, termin receptory pomocnicze, nie może zostać uznany za pojęcie systematyczne, gdyż receptory te nie stanowią aktywnych przekaźników sygnału. Do tej pory zidentyfikowano trzy główne receptory pomocnicze kaskady TGF $\beta$ , tj. betaglikan (TGF $\beta$ RIII), endoglinę (antygen CD105) oraz antygen CD109 (Tabela 2).

Betaglikan wykazuje w komórkach ludzkich powinowactwo do wszystkich trzech izoform TGF $\beta$ , niemniej jednak oddziaływanie to nie zachodzi z taką samą siłą w stosunku do każdej izoformy. Betaglikan najefektywniej wiąże się z TGF $\beta$ 2, tym samym wzmacnia sygnał pochodzący od tej właśnie izoformy. Niektórzy badacze postulują, że to właśnie tylko za pośrednictwem betaglikanu następuje przekazywanie sygnału indukowanego czynnikiem TGF $\beta$ 2, ponieważ powinowactwo tej izoformy do receptorów TGF $\beta$ RI i TGF $\beta$ RII jest stosunkowo niskie. Potwierdzeniem tego jest fakt, iż komórki niewykazujące ekspresji betaglikanu, są niewrażliwe na stymulację czynnikiem TGF $\beta$ 2 [17-20]. Analizując rolę endogliny w przekazywaniu sygnału stwierdzono, że oddziałuje ona zarówno z receptorem TGF $\beta$ RI jak i TGF $\beta$ RII. W przeciwieństwie do betaglikanu endoglina nie tworzy bezpośrednio kompleksów z izoformami czynników TGF $\beta$ . Tworzenie kompleksów z receptorami następuje niezależnie od obecności ligandów. Endoglina wykazuje powinowactwo tylko do izoform TGF $\beta$ 1 i TGF $\beta$ 3, przy czym najsilniej oddziałuje z izoformą TGF $\beta$ 1. Taki sposób oddziaływania z czynnikami TGF $\beta$  wynika ze specyficzności wiązania

się receptora TGF $\beta$ RII ze wspomnianymi izoformami. W literaturze znaleźć można również informacje wskazujące, na zdolność endogliny do oddziaływania z kompleksami sygnalizacyjnymi innych czynników z rodziny TGF $\beta$ . Stwierdzono, że endoglina wykazuje powinowactwo do aktywiny i czynnika BMP-7 związanych z receptorami ActRII lub ActRIIB, jak również z czynnikiem BMP-2 związanym z receptorem ALK3 lub ALK6 [21].

### **Zaburzenia w układzie kostno-mięśniowym**

Układ kostny pełni w organizmie człowieka różnorodne funkcje wśród których wyróżnić można: regulowanie stężenia jonów wapnia we krwi, stabilizację oraz ochronę narządów wewnętrznych, jak i miejsce procesów krwiotwórczych. Zbudowany jest on w głównej mierze z organicznej macierzy utworzonej przez kolagen typu I, wysyczonej nieorganicznymi kryształami hydroksyapatytu. Mineralno-organiczna budowa kości determinuje zachodzące w nich ciągłe procesy mineralizacji i demineralizacji, określane łącznie jako proces remodelowania, zachodzący przy udziale osteoklastów oraz osteoblastów. Znaczącą rolę w procesach resorpcji oraz formowania kości, odgrywa jedna z trzech izoform czynnika TGF $\beta$ , tj. izoforma pierwsza. TGF $\beta$ 1 zaangażowany jest w proces tworzenia kości, tj. stymulację proliferacji i różnicowanie komórek progenitorowych osteoblastów. Ekspresja TGF $\beta$  w tkance kostnej nie ograniczona jest tylko do okresu rozwoju embrionalnego, lecz ma miejsce również w organizmach dorosłych, w których to zaobserwowano podwyższony poziom ekspresji czynników TGF $\beta$  zwłaszcza podczas zrastania się złamań. Ponadto na skutek aktywności TGF $\beta$ 1 zahamowaniu ulega proces apoptozy osteoblastów [22]. Rolę TGF $\beta$ 1 w procesach fizjologicznych tkanki kostnej potwierdziły badania na modelu

mysim. Zwierzęta, u których zablokowano jego ekspresję wykazywały zahamowanie wzrostu i mineralizacji kości, a ponadto kości ich posiadały obniżoną elastyczność oraz aktywność fosfatazy alkalicznej. Innym ważnym czynnikiem z rodziny TGF $\beta$  zaangażowanym w metabolizm tkanki kostnej jest czynnik BMP, którego aktywność indukuje proces formowania kości. Selektywne zablokowanie ekspresji dwóch czynników z rodziny BMP, tj. BMP-2 oraz BMP-4 w listku mezenchymalnym, odpowiedzialnym za wykształcenie kończyn u myszy powodowało poważne zaburzenia w ich formowaniu [23]. Jednakże wyciszenie ekspresji powyższych czynników w sposób niezależny, tj. każdego z czynników z osobna, nie wpływało ujemnie na proces formowania kości kończyn. Niemniej jednak w przypadku czynnika BMP-2 przyczyniało się do zwiększenia podatności osobników na złamania, a także powodowało zahamowanie inicjacji procesu zrastania się złamanych kończyn. Podobnego efektu nie stwierdzono w przypadku braku ekspresji czynnika BMP-4 [24, 25]. Równie ważną rolę w procesie kościotworzenia pełnią odpowiednie receptory dla białek morfogenetycznych kości, tj. BMPRI1A oraz BMPRI1B, których wyciszenie ekspresji w chondrocytach jest przyczyną chondrodysplazji oraz zaburzeń formowania kości, na skutek zaburzonej proliferacji i różnicowania chondrocytów [26]. Jednostką chorobową związaną z mutacjami w genie kodującym izoformę TGF $\beta$ 1 jest zespół wad wrodzonych Camurati-Engelmana (CED, ang. *Camurati-Engelmann disease*), określanej inaczej jako postępująca dysplazja kości długich (ang. *progressive diaphyseal dysplasia*). Dziedziczony jest on w sposób autosomalny dominujący, natomiast najczęstszymi objawami tej niezwykle rzadkiej choroby genetycznej jest zwiększona gęstość oraz stwardnienie kości, zwłaszcza trzonów kości długich oraz czaszki, upośledzone funkcjonowanie szpiku kostnego, jak również

zmniejszenie siły motorycznej mięśni, kaczkowaty chód oraz silne bóle kostne [22, 27]. Do tej pory zidentyfikowano około 40 mutacji w genie TGF $\beta$ 1. Większość z nich dotyczy fragmentu genu kodującego region LAP, podczas gdy inne mają miejsce w regionie kodującym peptyd sygnałowy. Najczęściej występującymi mutacjami są mutacje typu „zmiany sensu” (ang. *missense mutation*), które prowadzą do zwiększonej ekspresji izoformy TGF $\beta$ 1, a tym samym wzmożonej odpowiedzi komórki na sygnał przez nią indukowany [28]. Ponadto badania na liniach komórkowych nabłonka nerki, które charakteryzowały mutacje identyfikowane w zespole Camuratiengo-Engelmana, wykazały zwiększony efekt autokryny oraz nasilenie transkrypcji genów aktywowanych czynnikami TGF $\beta$  [27]. Kolejną chorobą związaną z układem kostno-mięśniowym, u podstaw której leżą zaburzenia przekazywania sygnału szlaku TGF $\beta$  jest postępujące kostniejące zapalenie mięśni (FOP, ang. *fibrodysplasia ossificans progressiva*). Jest to choroba autosomalna dominująca, charakteryzująca się postępującym kostnieniem tkanki mięśniowej, co ma miejsce w sposób spontaniczny lub na skutek doznanego urazu, zabiegu chirurgicznego, bądź infekcji wirusowej. Molekularną przyczyną FOP jest mutacja w genie ACVR1, kodującym receptor typu I ALK2, prowadząca do podstawienia reszty argininy, zlokalizowanej w domenie GS receptora, resztą histydyny [29]. Mutacja ta wydaje się być charakterystyczna dla sporadycznych, jak i rodzinnych postaci choroby. Podobnie jak w przypadku mutacji obserwowanych w zespole CED, mutacja ta ma charakter aktywujący, tj. receptor nabiera konstytutywnej aktywności kinazowej w sposób niezależny od obecności ligandu [29, 30]. Analiza ekspresji genów w limfocytach oraz w komórkach progenitorowych zębów mlecznych pacjentów cierpiących na FOP wykazała zwiększony poziom ekspresji czynnika BMP-4, jak również

zwiększoną ekspresję genów indukowanych tymi czynnikami. Podwyższony poziom ekspresji obserwowano też w przypadku receptora typu I ALK3, co sugeruje jako przyczynę FOP zaburzenia przekazywania sygnału indukowanego czynnikami BMP. Równolegle stwierdzono również wzmożoną aktywność szlaku kinaz MAP (ang. *mitogen-activated protein*), które aktywowane są czynnikami BMP [31-34]. Zaburzenia w sygnalizacji BMP potwierdzone zostały na modelu mysim. Transgeniczne osobniki, u których indukowano nadekspresję czynnika BMP-4 wykazywały cechy fenotypowe zbliżone do ludzkiej postaci FOP [34]. Chorobami manifestującymi się skróceniem elementów szkieletowych i/lub nieprawidłowo wykształconymi stawami są chondrodysplazja typu Grebego (CGT, ang. *chondrodysplasia Grebe type*), bądź chondrodysplazja Huntera-Thompsona (CHTT, ang. *chondrodysplasia Hunter-Thompson type*). Pod względem molekularnym CHTT spowodowana jest mutacją zmiany sensu w obu allelach genu kodującego czynnik GDF-5, tym samym dziedziczona jest w sposób autosomalny recesywny. Mutacja ta powoduje całkowitą utratę funkcji wspomnianego białka [35]. Natomiast w przypadku CGT obserwowana jest w domenie funkcjonalnej substytucja zachowanej ewolucyjnie reszty cysteiny resztą tyrozyny. Rezultatem takiej zamiany jest nabycie przez białko GDF-5 zdolności do tworzenia heterokompleksów z białkami należącymi do podrodziny BMP [35-37]. Eksperymenty na zwierzętach, u których blokowano ekspresję czynnika GDF-5, potwierdziły jego funkcję w procesie kostnienia. Osobniki takie wykazywały zaburzenia kondensacji chrząstki oraz proliferacji chondrocytów [37]. Mutacje w genie GDF-5, których rezultatem jest zmniejszenie powinowactwa czynnika GDF-5 do receptora typu I ALK6 zostały zidentyfikowane także w brachodaktylii typu A2 (BDA2, ang. *brachodactyly type A2*). Choroba ta charakteryzuje się autosomalnym dominującym modelem

dziedziczenia, a objawia się skróceniem i zakrzywieniem paliczków palca wskazującego oraz pierwszego i drugiego palca u stóp [38]. Ponadto obserwowane są również mutacje zmiany sensu w regionie GS oraz domenie kinazowej receptora typu I ALK6. Delecja genu GDF-5 u myszy manifestowała się silną redukcją kości kończyn oraz nieprawidłowo wykształconymi połączeniami stawowymi [39]. Przeciwny skutek mutacji w genie GDF-5, tzn. wzrost powinowactwa receptora typu I ALK6 stwierdzono u osób dotkniętych zrostami kostnymi stawów śródrečno-paliczkowych (ang. *sympalangism*) czyli dziedziczną autosomalnie chorobą manifestującą się występowaniem sztywnych połączeń kostnych w stawach stóp i dłoni. Kolejną chorobą związaną z nieprawidłowościami w szlaku sygnalizacyjnym TGF $\beta$  jest osteoporoza (zrzesotnienie kości). W przeciwieństwie do omawianych wcześniej rzadkich jednostek chorobowych, ta występuje stosunkowo często, zwłaszcza wśród kobiet w wieku pomenopauzalnym. Rozwój osteoporozy jest wynikiem zaburzenia równowagi między procesami resorpcji i kostnienia, które w warunkach fizjologicznych podlegają wieloczynnikowej regulacji. Do głównych przyczyn związanych z czynnikami TGF $\beta$  należy zaliczyć występowanie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP, ang. *single nucleotide polymorphism*) w genach kodujących izoformę TGF $\beta$ 1 [22], receptory TGF $\beta$ RI oraz TGF $\beta$ RII, jak również białka efektorowe szlaku TGF $\beta$ , tj. Smad2, Smad3, Smad4 i Smad7 [40]. Polimorfizmy genu kodującego TGF $\beta$ 1 podzielono ze względu na miejsce ich występowania, tj. na promotorowe, kodujące, bądź intronowe. Pierwsze z nich przyczyniają się do zmienionego poziomu ekspresji czynnika TGF $\beta$ 1. Efektem polimorfizmów w obrębie sekwencji kodujących najczęściej są zaburzenia struktury czwartorzędowej lub zmieniony metabolizm kodowanego białka. Natomiast w przypadku

polimorfizmów zlokalizowanych w intronach, sugeruje się ich bezpośredni wpływ na proces składania pierwotnego transkryptu i możliwość powstawania różnych wariantów funkcjonalnych [22]. Potwierdzeniem powyższych przypuszczeń jest fakt występowania podwyższonego stężenia TGF $\beta$ 1 w surowicy krwi osób, u których zidentyfikowano wspomniane polimorfizmy. Ponadto, u osób z osteoporozą zaobserwowano obniżony efekt terapeutyczny witaminy D [41, 42], która wzmacnia procesy formowania kości poprzez indukcję proliferacji osteoblastów oraz mineralizację macierzy zewnątrzkomórkowej [22]. Omówione powyżej zaburzenia funkcji niektórych elementów kaskady TGF $\beta$  skutkowały nieprawidłowościami w procesie resorpcji oraz formowania kości, niemniej jednak istnieją dowody potwierdzające także ich znaczący udział w patogenezie chorób związanych z tkanką mięśniową. Za przykład może posłużyć dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD, ang. Duchenne muscular dystrophy), będąca jedną z najczęściej diagnozowanych chorób zanikowych mięśni. Początkowo dystrofii ulegają mięśnie szkieletowe, lecz wraz z postępem choroby obserwuje się zmiany także w mięśniu sercowym, prowadzące do kardiomiopatii. Pod względem etiologicznym pierwotną przyczyną DMD jest mutacja w genie niezwiązanym ze szlakiem TGF $\beta$ , kodującym białko dystrofinę [43]. Recesywny allel tego genu zlokalizowany jest na chromosomie X, przez co choroba ta podlega dziedziczeniu sprzężonemu z płcią. Obecność wspomnianej mutacji przyczynia się do obniżonego poziomu produktu białkowego. U pacjentów z DMD stwierdzono dodatkowo współistnienie mutacji zmiany sensu w genie czynnika GDF-8, znanego również z racji pełnionej funkcji jako miostatyna. GDF-8 to tkankowo specyficzny ligand z rodziny TGF $\beta$ , którego ekspresja charakterystyczna jest dla komórek tkanki mięśniowej. Pod jego kontrolą znajdują się procesy wzrostu komórek mięśniowych, a dokładniej

hamowanie ich wzrostu. Potwierdzeniem potencjalnej roli czynnika GDF-8 są wyniki badań, które wykazały, że u myszy *knock-out* genu GDF-8 z jednoczesnym współwystępowaniem mutacji genu dystrofiny powoduje pojawienie się fenotypu przeciwnego do obserwowanego w DMD, tj. zwiększoną masę oraz siłę mięśniową zwierząt [44, 45].

### **Nieprawidłowości w układzie naczyniowym**

Układ naczyniowy człowieka obejmują naczynia krwionośne oraz limfatyczne, zbudowane z pojedynczej warstwy komórek endotelium, otoczonych wieloma warstwami komórek tkanki mięśniowej gładkiej, a także perycytami. Procesy formowania układu naczyniowego noszą nazwę procesów waskulogenezy i angiogenezy [46]. Pierwszy z wymienionych procesów dotyczy formowania *de novo* pierwotnych naczyń w rozwijającym się zarodku, podczas gdy angiogeneza dotyczy wytwarzania nowych rozgałęzień już istniejącej funkcjonalnej sieci naczyń. Angiogenezę obserwuje się podczas całego życia organizmu, jego wzrostu oraz w trakcie gojenia się ran, jak również w następstwie niektórych procesów patofizjologicznych, tj. progresji i przerzutowania zmian nowotworowych oraz w przypadku chorób naczyniowych [47]. Regulacja procesów angiogenezy pozostaje pod ścisłą kontrolą różnorodnych współoddziałujących ze sobą szlaków sygnalizacyjnych, wśród których istotną rolę odgrywa kaskada sygnałowa inicjowana czynnikami TGF $\beta$ . Jednakże w przypadku aktywności czynników z rodziny TGF $\beta$  zjawisko regulacji procesu angiogenezy cechuje znacząca złożoność, wynikająca z plejotropowego wpływu tych czynników na komórki nabłonka. Czynniki te mogą pełnić rolę inhibitorów i/lub aktywatorów procesu formowania nowych naczyń. Ich wpływ nie zależy tylko od rodzaju działającego czynnika, lecz



również od stopnia zaawansowania całego procesu. Niektóre z nich początkowo pełnią funkcję ograniczającą rozrost naczyń włosowatych, tak aby w późniejszych etapach przybrać charakter aktywujący. Rola poszczególnych komponentów szlaku TGF $\beta$  została bliżej poznana dzięki badaniom na modelach mysich, w których hamowanie ekspresji wybranych elementów kaskady powodowało ujawnienie się patologicznego fenotypu. Nieprawidłowości dotyczące układu krwionośnego stwierdzono w przypadku wyciszania genów kodujących receptory typu I i II ALK1, ALK5 i TGF $\beta$ RII, receptory pomocnicze betaglikan i endoglinę oraz białka efektorowe Smad1, Smad2, Smad4, Smad5, Smad6 i Smad7. Zahamowanie ekspresji receptorów ALK1, ALK5 oraz TGF $\beta$ RII przyczyniało się do zaburzeń rozwoju sieci naczyń krwionośnych, natomiast brak ekspresji białek z rodziny Smad skutkowało nieprawidłowościami w rozwoju i funkcjonowaniu serca. Ponadto stwierdzono komórkowo-specyficzną ekspresję endogliny w intensywnie proliferujących komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych. Komórki endotelium pochodzące od embrionów o fenotypie endoglina -/- wykazywały obniżony poziom migracji oraz niezdolność do prawidłowej proliferacji w warunkach *in vitro* [47-50]. Dotychczas zidentyfikowane zostało kilkadziesiąt mutacji w genach kodujących komponenty szlaku TGF $\beta$  mających jak się okazało decydujące znaczenie w rozwoju wybranych chorób układu naczyniowego. Przykładem choroby w etiologię, której zaangażowana jest kaskada TGF $\beta$  jest wrodzona naczyniakowatość krwotoczna (HHT, ang. *hereditary hemorrhagic telangiectasia*), określana również jako zespół Rendu-Oslera-Webera. Jest to choroba dziedziczona w sposób autosomalny dominujący, charakteryzująca się częstością występowania około 1/7500 przypadków [51]. Do głównych jej objawów należą dysplazje naczyń włosowatych, obejmujące zależnie od typu

(HHT1, HHT2) różne narządy wewnętrzne. W przypadku HHT1 obserwowana jest przewaga zaburzeń w wykształceniu połączeń tętniczo-żylnych w obrębie płuc, wątroby oraz mózgu, podczas gdy w HHT2 występujące malformacje tętniczo-żylne dotyczą znacznie częściej kanalików nerkowych [52]. Podobieństwo cech klinicznych obu typów HHT sprawia, że jednoznaczna diagnoza może zostać postawiona jedynie dzięki badaniom genetycznym na obecność określonych mutacji. Liczne badania potwierdziły bezsporny udział komponentów szlaku TGF $\beta$ , tj. endogliny oraz receptora typu I ALK1 w rozwoju HHT [50]. Mutacje w genie ENG kodującym endoglinę stwierdzono u chorych na HHT typu pierwszego. Lokalizacja mutacji ograniczona jest do regionu kodującego domenę zewnątrzkomórkową endogliny. Przyczyniają się one zatem do nieprawidłowego wiązania ligandów, co skutkuje wadliwym przekazywaniem sygnału indukowanego czynnikami TGF $\beta$ . Mutacje genu endogliny obejmują szeroki wachlarz zmian, tj. delecje, insercje, mutacje zmiany sensu, nonsensowne, jak również zmiany składania pierwotnego transkryptu [53, 54]. Większość z tych mutacji skutkuje biosyntezą białka posiadającego skrócony łańcuch aminokwasowy, co uniemożliwia jego eksport do błony komórkowej, miejsca występowania i aktywności endogliny [55]. Natomiast typ drugi HHT związany jest z obecnością mutacji genu ACVRL1, który odpowiedzialny jest za syntezę receptora typu I ALK1. W przeciwieństwie do mutacji w genie endogliny, zidentyfikowane mutacje dotyczą sekwencji kodujących domenę zewnątrz- oraz wewnątrzkomórkową, jak również fragment transbłonowy białka. Największą liczbę mutacji wykryto w domenie cytoplazmatycznej, która ma decydujące znaczenie w przekazywaniu sygnału [51, 55, 56]. Głównym mechanizmem, którego zaburzenia prowadzą do rozwoju wrodzonej naczyniakowatości krwotocznej jest współistnienie w komórkach

endotelium dwóch wykluczających się szlaków indukowanych czynnikami z rodziny TGF $\beta$  [57]. W pierwszym z nich przekazanie sygnału ma miejsce za pośrednictwem receptora typu I ALK1, co skutkuje aktywacją procesów proliferacji i migracji komórek endotelium. Przeciwny efekt obserwowany jest natomiast w sytuacji, gdy sygnał zewnątrzkomórkowy przekazywany jest do wnętrza komórki przez receptor typu I ALK5 [51, 55]. Klamrą spinającą oba mechanizmy jest w tym przypadku endogлина, która może oddziaływać zarówno z receptorem ALK1 oraz ALK5 [58-60].

### **Nieprawidłowości w układzie rozrodczym**

Rodzina czynników TGF $\beta$  odgrywa również znaczącą rolę w rozwoju i funkcjonowaniu układu rozrodczego. Dzięki aktywności ligandów TGF $\beta$  regulowane są takie procesy jak rozwój pęcherzyków jajnikowych, rekrutowanie pęcherzyków pierwotnych, proliferacja komórek warstwy ziarnistej i osłonki oocytu, ekspresja receptorów gonadotropin, dojrzewanie oocytu, owulacja, luteinizacja oraz formowanie ciała żółtego, czy rozwoju jąder [61, 62]. Kluczową rolę w wymienionych procesach odgrywają aktywiny oraz inhibiny, które są wzajemnymi antagonistami. Poprzez wiązanie się z receptorem pomocniczym kaskady TGF $\beta$  betaglikanem, inhibiny działają hamująco na sygnalizację pochodzącą od aktywiny, blokując im tym samym dostępność receptora typu II. Innym zidentyfikowanym antagonistą aktywiny warunkującym zahamowanie sygnalizacji pochodzącej od czynników BMP jest folistatyna [63, 64]. Wpływ aktywiny i inhibiny w fizjologicznych warunkach na rozwój i funkcjonowanie układu rozrodczego potwierdzają badania na modelach mysich w których wykazano, że nadekspresja inhibiny A prowadzi u osobników męskich do obniżenia wielkości jąder, podczas gdy u samic skutkuje

upośledzeniem dojrzewania pęcherzyków jajnikowych. Zwiększona ekspresja inhibiny A przyczynia się do zaburzonej sekrecji hormonu folikulotropowego (FSH, ang. *follicle-stimulating hormone*) przez przysadkę [65]. Podobny efekt do nadekspresji inhibiny A uzyskano wyciszając ekspresję genu receptora dla aktywiny ACVR2, co prowadziło u samic do bezpłodności, podczas gdy u samców dochodziło do zmniejszenia wielkości jąder [62]. W warunkach fizjologicznych, podczas rozwoju embrionalnego ssaków, komórki Sertolego obecne w jądrach wytwarzają hormony odpowiedzialne za prawidłowe wykształcenie męskiego układu rozrodczego. Pod wpływem testosteronu przewody Wolffa ulegają przekształceniu w najądrze, nasieniowód oraz kanaliki nasienne, podczas gdy czynnik z rodziny TGF $\beta$ , tj. MIS/AMH warunkuje zanik przewodów Müllera w rozwijającym się jądrze. W przypadku braku sekrecji czynnika MIS/AMH przez komórki Sertolego, przewody Müllera rozwijają się w jajowody, macicę oraz pochwę. Brak regresji przewodów Müllera w zarodku męskim charakteryzuje bardzo rzadką jednostkę chorobową, uwarunkowaną genetycznie o recesywnym modelu dziedziczenia, określaną jako zespół przetrwałych przewodów Müllera (PMDS, ang. *persistent Müllerian duct syndrome*). Choroba ta manifestuje się obecnością jajowodów oraz macicy u osobników fenotypowo męskich na skutek zbyt niskiego poziomu czynnika MIS/AMH w trakcie rozwoju płodowego. Aktualnie zidentyfikowano 38 mutacji w genie kodującym czynnik MIS/AMH, odpowiedzialnych za obniżenie jego stężenia. Najczęściej są to mutacje zmiany sensu w obrębie domeny C-końcowej. Obecność mutacji w genie kodującym MIS/AMH skutkuje nieprawidłowym transportem syntetyzowanych cząsteczek czynnika z siateczki śródplazmatycznej, bądź wpływa na tworzenie struktur wyższego rzędu i obniżenie stabilność produktu białkowego w komórce. Oprócz obniżonego

poziomu ekspresji czynnika MIS/AMH u osób z PMDS obserwuje się również mutacje w genie kodującym receptor typu II dla tego czynnika, tj. MISRII/AMHRII. Rezultatem mutacji w receptorze MISRII/AMHRII jest formowanie postaci rozpuszczalnej receptora lub syntetyzowanie skróconego białka pozbawionego domeny kinazowej. Forma rozpuszczalna receptora nie wbudowuje się do błony cytoplazmatycznej komórki, podczas gdy brak domeny kinazowej uniemożliwia prawidłowe wiązanie ligandu przez receptor. Oba zaburzenia molekularne dają podobny obraz kliniczny i są praktycznie nie do odróżnienia bez badań molekularnych. Ponadto zidentyfikowano również przypadki kliniczne, w których pomimo prawidłowej ekspresji czynnika MIS/AMH i receptora MISRII/AMHRII występują cechy zespołu przetrwałych przewodów Müllera. Jednakże dotychczasowe badania dotyczące innych komponentów kaskady TGF $\beta$  nie wykazały obecności zaburzeń molekularnych na tym poziomie [66-69]. Inną jednostką chorobową związaną z zaburzeniami w sygnalizacji TGF $\beta$ , a dotyczącą układu rozrodczego człowieka jest zespół przedwczesnego wygasania funkcji jajników (POF, ang. *premature ovarian failure*). Choroba ta wiąże się z zanikiem funkcji jajników u kobiet poniżej czterdziestego roku życia i jest jedną z przyczyn wtórnego braku miesiączki oraz niepłodności. Czynniki związanymi z chorobą jest wysokie stężenie gonadotropin oraz hipolestrogenizm, jak również zanik czynności jajników, w którym dochodzi do rozwoju tkanki łącznej w miejscu pęcherzyków jajnikowych. Obecnie zidentyfikowane zostały mutacje w genach kodującym czynnik BMP-15 oraz podjednostkę  $\alpha$  inhibiny A. Wydaje się również, że za występowanie POF odpowiedzialny jest polimorfizm w eksonie 12 genu kodującego receptor pomocniczy kaskady TGF $\beta$ , tj. betaglikan [70-73].

## Podsumowanie

Nieprawidłowości w kaskadzie TGF $\beta$  mają charakter zarówno uwarunkowany genetycznie, jak i są zaburzeniami spontanicznymi, zaistniałymi podczas rozwoju embrionalnego. Identyfikacja molekularnych przyczyn dysfunkcji na poziomie przekazywania sygnału w szlaku TGF $\beta$  umożliwi w przyszłości wytypowanie nowych potencjalnych celów dla interwencji farmakologicznych. Poznanie roli szlaku TGF $\beta$  w etiologii różnych chorób wydaje się być cenne w opracowywaniu nowych strategii terapeutycznych lub metod diagnostycznych.

## Podziękowania

*Podziękowania dla prof. dr hab. Wandy M. Krajewskiej za pomoc oraz cenne uwagi podczas przygotowywania pracy.*

Praca finansowana z dotacji na prowadzeniu badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich (Rozporządzenie MNiSW z 5 listopada 2010 r.).

## Piśmiennictwo

1. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997; 390: 465-471.
2. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005; 16: 251-263.
3. De Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004; 15: 1-11.

4. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003; 113: 685-700.
5. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell*. 2008; 134: 215-230.
6. Derynck R, Akhurst RJ. Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. *Nat Cell Biol*. 2007; 9: 1000-1004.
7. Roberts AB, Wakefield LM. The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 8621-8623.
8. Rahimi RA, Leof EB. TGF-beta signaling: a tale of two responses. *J Cell Biochem*. 2007; 102: 593-608.
9. Padua D, Massague J. Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res*. 2009; 19: 89-102.
10. Mokrosinski J, Krajewska WM. TGF beta signalling accessory receptors. *Postepy Biochem*. 2008; 54: 264-273.
11. Yang Z, Mu Z, Dabovic B, Jurukovski V, Yu D, Sung J i wsp. Absence of integrin-mediated TGFbeta1 activation in vivo recapitulates the phenotype of TGFbeta1-null mice. *J Cell Biol*. 2007; 176: 787-793.
12. Massague J, Gomis RR. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett*. 2006; 580: 2811-2820.
13. Stover DG, Bierie B, Moses HL. A delicate balance: TGF-beta and the tumor microenvironment. *J Cell Biochem*. 2007; 101: 851-861.
14. Glasgow E, Mishra L. Transforming growth factor-beta signaling and ubiquitinators in cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2008; 15: 59-72.
15. ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci*. 2004; 29: 265-273.
16. Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells*. 2002; 7: 1191-1204.
17. Rotzer D, Roth M, Lutz M, Lindemann D, Sebald W i wsp. Type III TGF-beta receptor-independent signalling of TGF-beta2 via TbetaRII-B, an alternatively spliced TGF-beta type II receptor. *EMBO J*. 2001; 20: 480-490.
18. Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Quintanilla M. The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1792: 954-973.
19. Santander C, Brandan E. Betaglycan induces TGF-beta signaling in a ligand-independent manner, through activation of the p38 pathway. *Cell Signal*. 2006; 18: 1482-1491.
20. Wiater E, Harrison CA, Lewis KA, Gray PC, Vale WW. Identification of distinct inhibin and transforming growth factor beta-binding sites on betaglycan:

- functional separation of betaglycan co-receptor actions. *J Biol Chem.* 2006; 281: 17011-17022.
21. Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem.* 1999; 274: 584-594.
  22. Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev.* 2005; 26: 743-774.
  23. Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet.* 2006; 2: e216.
  24. Tsuji K, Cox K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Tabin CJ, Rosen V. BMP4 is dispensable for skeletogenesis and fracture-healing in the limb. *J Bone Joint Surg Am.* 2008; 90 Suppl 1: 14-18.
  25. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L i wsp. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet.* 2006; 38: 1424-1429.
  26. Yoon BS, Ovchinnikov DA, Yoshii I, Mishina Y, Behringer RR, Lyons KM. *Bmpr1a* and *Bmpr1b* have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 5062-5067.
  27. Janssens K, ten Dijke P, Ralston SH, Bergmann C, Van Hul W. Transforming growth factor-beta 1 mutations in Camurati-Engelmann disease lead to increased signaling by altering either activation or secretion of the mutant protein. *J Biol Chem.* 2003; 278: 7718-7724.
  28. Harradine KA, Akhurst RJ. Mutations of TGFbeta signaling molecules in human disease. *Ann Med.* 2006; 38: 403-414.
  29. Groppe JC, Shore EM, Kaplan FS. Functional modeling of the ACVR1 (R206H) mutation in FOP. *Clin Orthop Relat Res.* 2007; 462: 87-92.
  30. Yu PB, Deng DY, Lai CS, Hong CC, Cuny GD, Bouxsein ML i wsp. BMP type I receptor inhibition reduces heterotopic [corrected] ossification. *Nat Med.* 2008; 14: 1363-1369.
  31. Fiori JL, Billings PC, De La Pena LS, Kaplan FS, Shore EM. Dysregulation of the BMP-p38 MAPK signaling pathway in cells from patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *J Bone Miner Res.* 2006; 21: 902-909.
  32. Billings PC, Fiori JL, Bentwood JL, O'Connell MP, Jiao X, Nussbaum B i wsp. Dysregulated BMP signaling and enhanced osteogenic differentiation of



- connective tissue progenitor cells from patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *J Bone Miner Res.* 2008; 23: 305-313.
33. Kaplan FS, Fiori J, De La Pena LS, Ahn J, Billings PC, Shore EM. Dysregulation of the BMP-4 signaling pathway in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1068: 54-65.
  34. Kan L, Hu M, Gomes WA, Kessler JA. Transgenic mice overexpressing BMP4 develop a fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP)-like phenotype. *Am J Pathol.* 2004; 165: 1107-1115.
  35. Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell.* 2000; 103: 295-309.
  36. Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998; 9: 49-61.
  37. Thomas JT, Lin K, Nandedkar M, Camargo M, Cervenka J, Luyten FP. A human chondrodysplasia due to a mutation in a TGF-beta superfamily member. *Nat Genet.* 1996; 12: 315-317.
  38. Lehmann K, Seemann P, Stricker S, Sammar M, Meyer B, Suring K i wsp. Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 12277-12282.
  39. Seemann P, Schwappacher R, Kjaer KW, Krakow D, Lehmann K, Dawson K i wsp. Activating and deactivating mutations in the receptor interaction site of GDF5 cause symphalangism or brachydactyly type A2. *J Clin Invest.* 2005; 115: 2373-2381.
  40. Watanabe Y, Kinoshita A, Yamada T, Ohta T, Kishino T, Matsumoto N i wsp. A catalog of 106 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and 11 other types of variations in genes for transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and its signaling pathway. *J Hum Genet.* 2002; 47: 478-483.
  41. Yamada Y, Harada A, Hosoi T, Miyauchi A, Ikeda K, Ohta H i wsp. Association of transforming growth factor beta1 genotype with therapeutic response to active vitamin D for postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2000; 15: 415-420.
  42. Yamada Y, Miyauchi A, Goto J, Takagi Y, Okuizumi H, Kanematsu M i wsp. Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res.* 1998; 13: 1569-1576.
  43. Nishiyama A, Takeshima Y, Saiki K, Narukage A, Oyazato Y, Yagi M i wsp. Two novel missense mutations in the myostatin gene identified in Japanese patients with Duchenne muscular dystrophy. *BMC Med Genet.* 2007; 8: 19

44. Wagner KR, McPherron AC, Winik N, Lee SJ. Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann Neurol.* 2002; 52: 832-836.
45. Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, Morris LD, Whitemore LA, Ahima RS i wsp. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature.* 2002; 420: 418-421.
46. Brouillard P, Vikkula M. Genetic causes of vascular malformations. *Hum Mol Genet.* 2007; 16 Spec No. 2: R140-R149.
47. Goumans MJ, Liu Z, ten Dijke P. TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res.* 2009; 19: 116-127.
48. Gordon KJ, Blobe GC. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1782: 197-228.
49. Otten J, Bokemeyer C, Fiedler W. Tgf-Beta superfamily receptors-targets for antiangiogenic therapy? *J Oncol.* 2010; 2010: 317068-
50. ten Dijke P, Arthur HM. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8: 857-869.
51. Fernandez L, Sanz-Rodriguez F, Blanco FJ, Bernabeu C, Botella LM. Hereditary hemorrhagic telangiectasia, a vascular dysplasia affecting the TGF-beta signaling pathway. *Clin Med Res.* 2006; 4: 66-78.
52. Sabba C, Pasculli G, Lenato GM, Suppressa P, Lastella P, Memeo M i wsp. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: clinical features in ENG and ALK1 mutation carriers. *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 1149-1157.
53. van den Driesche S, Mummery CL, Westermann CJ. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an update on transforming growth factor beta signaling in vasculogenesis and angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 2003; 58: 20-31.
54. Prigoda NL, Savas S, Abdalla SA, Piovesan B, Rushlow D, Vandezande K i wsp. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: mutation detection, test sensitivity and novel mutations. *J Med Genet.* 2006; 43: 722-728.
55. Abdalla SA, Letarte M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet.* 2006; 43: 97-110.
56. Park SO, Lee YJ, Seki T, Hong KH, Fliess N, Jiang Z, i wsp. ALK5- and TGFBR2-independent role of ALK1 in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Blood.* 2008; 111: 633-642.
57. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* 2002; 21: 1743-1753.

58. Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, ten Dijke P. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res.* 2005; 65: 599-608.
59. Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M i wsp. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J.* 2004; 23: 4018-4028.
60. Blanco FJ, Santibanez JF, Guerrero-Esteo M, Langa C, Vary CP, Bernabeu C. Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol.* 2005; 204: 574-584.
61. Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction.* 2006; 132: 191-206.
62. Matzuk MM, Kumar TR, Bradley A. Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature.* 1995; 374: 356-360.
63. Bilezikjian LM, Blount AL, Donaldson CJ, Vale WW. Pituitary actions of ligands of the TGF-beta family: activins and inhibins. *Reproduction.* 2006; 132: 207-215.
64. Lewis KA, Gray PC, Blount AL, MacConell LA, Wiater E, Bilezikjian LM i wsp. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature.* 2000; 404: 411-414.
65. Pierson TM, Wang Y, DeMayo FJ, Matzuk MM, Tsai SY, Omalley BW. Regulable expression of inhibin A in wild-type and inhibin alpha null mice. *Mol Endocrinol.* 2000; 14: 1075-1085.
66. Josso N, Belville C, di Clemente N, Picard JY. AMH and AMH receptor defects in persistent Müllerian duct syndrome. *Hum Reprod Update.* 2005; 11: 351-356.
67. Belville C, Van Vlijmen H, Ehrenfels C, Pepinsky B, Rezaie AR, Picard JY i wsp. Mutations of the anti-müllerian hormone gene in patients with persistent müllerian duct syndrome: biosynthesis, secretion, and processing of the abnormal proteins and analysis using a three-dimensional model. *Mol Endocrinol.* 2004; 18: 708-721.
68. Belville C, Josso N, Picard JY. Persistence of Müllerian derivatives in males. *Am J Med Genet.* 1999; 89: 218-223.
69. Belville C, Marechal JD, Penetier S, Carmillo P, Masgrau L, Messika-Zeitoun L i wsp. Natural mutations of the anti-Müllerian hormone type II receptor found in persistent Müllerian duct syndrome affect ligand binding, signal transduction and cellular transport. *Hum Mol Genet.* 2009; 18: 3002-3013.
70. Beck-Peccoz P, Persani L. Premature ovarian failure. *Orphanet J Rare Dis.* 2006; 1: 9

71. Di Pasquale E, Rossetti R, Marozzi A, Bodega B, Borgato S, Cavallo L i wsp. Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91: 1976-1979.
72. Chand AL, Ooi GT, Harrison CA, Shelling AN, Robertson DM. Functional analysis of the human inhibin alpha subunit variant A257T and its potential role in premature ovarian failure. *Hum Reprod.* 2007; 22: 3241-3248.
73. Shelling AN, Burton KA, Chand AL, van Ee CC, France JT, Farquhar CM i wsp. Inhibin: a candidate gene for premature ovarian failure. *Hum Reprod.* 2000; 15: 2644-2649.