

DYSTROFIE MIĘŚNIOWE SPOWODOWANE ZABURZENIAMI GLIKOZYLACJI DYSTROGLIKANU

MUSCULAR DYSTROPHIES DUE TO DYSTROGLYCAN GLYCOSYLATION DISORDERS

Mirosława FERENS-SIECZKOWSKA

Katedra Chemii i Immunochemii Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich
we Wrocławiu

Streszczenie: U podłoża dużej grupy dystrofii mięśniowych leżą zaburzenia potranslacyjnej modyfikacji α -dystroglikanu, polegającej na unikalnym rodzaju glikozylacji. Schorzenia te określa się mianem dystroglikanopatii. Nawet do 50% glikanów w mucynopodobnym regionie α -dystroglikanu stanowią oligosacharydy, w których do seryny lub treoniny polipeptydu przyłączona jest mannoza wiązaniem O-glikozydowym. Elongacja glikanu obejmuje przyłączenie N-acetyloglucozamininy, galaktozy, kwasu sialowego i opcjonalnie fukozy. Wydaje się, że dla prawidłowego działania dystroglikanu mannoza dodatkowo musi być fosforylowana. Glikany o właściwej strukturze umożliwiają oddziaływanie dystroglikanu z lamininą błony podstawnej. Patomechanizm dystroglikanopatii obejmuje uszkodzenia w obrębie 6 genów: *POMT-1*, *POMT-2*, *POMGnT-1*, *FKT*, *FKRP* i *LARGE*. Trzy pierwsze białka są swoistymi glikozylo-transferazami szlaku O-mannozytacji, dla trzech kolejnych postuluje się analogiczną funkcję. Dystroglikanopatie są kolejną grupą schorzeń pokazujących, że glikozylacja może stanowić istotny mechanizm regulacyjny, niezbędny dla zachowania prawidłowej funkcji białek.

Słowa kluczowe: dystrofia mięśniowa, dystroglikan, dystroglikanopatie, glikozylacja, O-mannozyłacja, glikozylotransferazy.

Summary: Disorders in a unique type of posttranslational modification of α -dystroglycan lay at a background of a group of congenital muscular dystrophies, called dystroglycanopathies. To bind laminin in a basal membrane the protein has to be glycosylated in a special way, with mannose linked with O-glycosidic bond to serine or threonine in a mucin-like region. The nascent glycan is then elongated with N-acetylglucosamine, galactose, sialic acid and optionally fucose. It is also suggested that proper function of dystroglycan depends on mannose phosphorylation. Six genes are involved in the molecular pathogenesis of dystroglycanopathies: *POMT-1*, *POMT-2*, *POMGnT-1*, *FKT*, *FKRP* and *LARGE*. The former three are proved, and the further putative glycosyltransferases of O-mannosylation pathway. The mechanisms of dystroglycanopathy once again underline the peculiar regulatory role of glycosylation, indispensable for a proper function of particular proteins.

Keywords: muscular dystrophy, dystroglycan, dystroglycanopathy, glycosylation, O-mannosylation, glycosyltransferases.

Wykaz skrótów: **DG** – dystroglikan; **ECM** – macierz zewnątrzkomórkowa; **ER** – siateczka śródplazmatyczna; **ERAD** – system degradacji nieprawidłowo sfalutowanych białek związany z siateczką śródplazmatyczną; **Gal** – galaktoza; **GalNAc** – N-acetylogalaktozamina; **GlcNAc** – N-acetyloglukozoamina; **FCMD** – twarzowo-szczękowa dystrofia mięśniowa; **FKRP** – białko spokrewnione z fukutyną; **FKT** – fukutyna; **LGMD** – kończynowo-obręczowa dystrofia mięśniowa; **Man** – mannoza; **MEB** – dystrofia mięśniowo-oczno-mózgowa; **POMGnT** – GlcNAc-transferaza swoista wobec mannozy związanej z białkiem wiązaniem O-glikozydowym; **POMT** – mannozylotransferaza przyłączająca Man wiązaniem O-glikozydowym do Ser/Thr białka; **Sia** – kwas sjałowy; **WWS** – zespół Warburga-Walkera

WSTĘP

Glikozylacja jest uważana za jedną z najważniejszych i najbardziej powszechnych modyfikacji potranslacyjnych białka. Decydującym dla uzmysłowienia jej roli było odkrycie genetycznie uwarunkowanych defektów szlaku biosyntezy glikanów jako przyczyny ciężkich chorób, związanych z zahamowaniem rozwoju fizycznego i umysłowego, zaburzeniem funkcji wielu narządów, oraz dużą śmiertelnością w okresie wczesnodziecięcym [12]. W przypadku niektórych genów uważa się, że efekt letalny występuje już w okresie rozwoju płodowego. W ciągu 20 lat od odkrycia glikozylacji jako przyczyny tych chorób, zwanych dzisiaj wrodzonymi zaburzeniami glikozylacji – CDG (*congenital disorders of glycosylation*), opisano ponad czterdzieści tego typu schorzeń, a dla nielicznych na podstawie poznanych mechanizmów molekularnych opracowano skuteczne terapie [16, 33].

Łańcuchy cukrowe w glikoproteinach mogą być przyłączone do części białkowej dwoma typami wiązań. N-glikozylacja prowadzi do przyłączenia oligosacharydów z N-acetyloglukozoaminą (GlcNAc) na końcu redukującym wiązaniem N-glikozydowym do Asn polipeptydu. O-glikozylacja polega na przyłączeniu cukrów wiązaniem O-glikozydowym do grup hydroksylowych Ser lub Thr białka. Ten rodzaj glikozylacji jest znacznie bardziej zróżnicowany. W O-glikanach typu mucynowego pierwszym monosacharydem w łańcuchu jest N-acetylogalaktozamina (GalNAc). W glikoaminoglikanach rdzeń polisacharydu stanowi sekwencja cukrowa Xyl-Xyl-Gal (dwie reszty ksylozy i galaktoza), a długie łańcuchy cukrowe budują powtarzające się jednostki disacharydów złożonych z aminocukru i kwasu uronowego, często silnie siarczanowane. Rozwój glikobiologii przyniósł odkrycie kolejnych, unikalnych typów O-glikozylacji. Podlegają im nieliczne białka, ale znaczenie takiej modyfikacji pozostaje kluczowe dla organizmu, poczynając od jego rozwoju embrionalnego (O-fukozylacja) [35], poprzez regulację aktywności białek jądrowych (cykl przyłączenia O-GlcNAc) [23], po integralność komórki mięśniowej (O-mannozylicacja) [20, 30]. Zaburzenia w obrębie tej ostatniej modyfikacji są przyczyną szczególnej grupy wrodzonych dystrofii mięśniowych, określanych wspólnym mianem dystroglikanopatii [15, 25, 28]. W schorzeniach należących do tej grupy dramatycznie obniżona jest zdolność α -dystroglikanu do wiązania podstawowego ligandu w obrębie błony podstawnej, lamininy, a dystrofii mięśni szkieletowych zazwyczaj towarzyszą zaburzenia rozwoju umysłowego i narządu wzroku [2, 10, 25].

O-MANNOZYLACJA

Przyłączenie mannozy wiązaniem O-glikozydowym do seryny lub treoniny łańcucha polipeptydowego jest powszechną modyfikacją białek ściany komórkowej drożdży. Proces zapoczątkowuje O-mannozylotransferaza Dol-P-Man:białko, zlokalizowana w siateczce śródplazmatycznej. Glikan jest wydłużany o kolejne reszty mannozy (zazwyczaj kilka, maksymalnie 13) przez kolejne mannozylotransferazy obecne w błonach cystern aparatu Golgiego. Oligomannozyłacja glikoprotein ściany komórkowej drożdży jest niezbędna dla utrzymania jej integralności i sztywności. Mutanty pozbawione aktywności rozpoczynającej szlak mannozylotransferazy giną [39]. Za kolejną istotną funkcję mannozyłacji w komórkach niższych eukariontów uważa się utrzymywanie nieprawidłowo sfałdowanych białek w formie rozpuszczalnej, co zapobiega ich agregacji i nie dopuszcza do przeciążenia systemu ERAD w warunkach stresu [20].

Do niedawna proces ten był uważany za typowy jedynie dla niższych eukariontów i nieobecny zarówno u roślin, jak i u zwierząt. Obecnie wiadomo, że O-mannozyłowane struktury można zidentyfikować u wszystkich istot żywych, aczkolwiek modyfikacji tej podlegają nieliczne białka. Ten szczególny rodzaj glikozyłacji okazuje się za to niezbędny dla zachowania ich funkcji [21, 30].

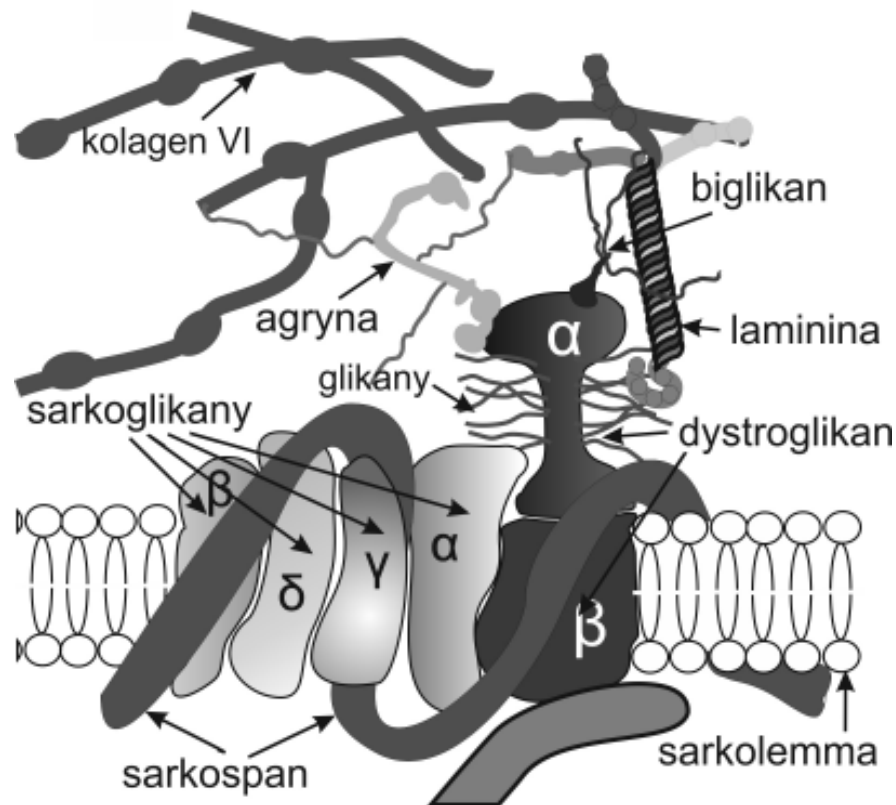
Inicjacja szlaku O-mannozyłacji jest procesem wysoce konserwatywnym ewolucyjnie. Podobnie jak u drożdży, u ssaków pierwsza reakcja polega na przeniesieniu reszty mannozy z dolichylofosforanu (Dol-P-Man) na grupę hydroksylową seryny lub treoniny białka przez swoistą mannozylotransferazę w obrębie siateczki śródplazmatycznej. Dla prawidłowego przebiegu procesu niezbędna jest obecność dwóch enzymów: POMT-1 i POMT-2 (mannozylotransferaza DolPMan : białko 1 i 2), filogenetycznie spokrewnionych zarówno ze sobą, jak i z enzymami drożdży [30, 39]. Dalsze losy powstającego glikanu u ssaków przebiegają całkowicie odmiennie. Wydłużenie polega na dołączeniu reszty GlcNAc do drugiego węgla (C2) mannozy w reakcji katalizowanej przez GlcNAc-transferazę UDPGlcNAc : ManSer/Thr (POMGnT-1). W następnej kolejności możliwe jest też przyłączenie drugiej reszty GlcNAc do węgla C6 mannozy, co powoduje rozgałęzienie glikanu. Enzym, N-acetyloglukozaminylotransferaza GnT-IX rozpoznaje jako akceptor reszty monosacharydowej strukturę GlcNAc → 2Man → Ser/Thr. Dalsze wydłużanie oligosacharydu polega na przyłączeniu reszt galaktozy, kwasu sialowego i opcjonalnie fukozy [21, 39]. Reakcje te są katalizowane przez enzymy aparatu Golgiego, biorące udział także w elongacji klasycznych struktur N- i O-glikanów. Nietypowe zakończenie łańcucha jest możliwe w glikoproteinach mózgowych i polega na uzupełnieniu galaktozy resztą siarczanowanego kwasu glukuronowego, z utworzeniem tzw. epitopu HNK-1 [21]. Reakcję tę przeprowadza kolejna wysoce swoista glukuronylotransferaza.

Według obecnych danych O-mannozyłacja w komórkach ssaków ograniczona jest do niewielkiej liczby glikoprotein, przede wszystkim mózgu, nerwów i mięśni szkieletowych. Jedynym zidentyfikowanym ludzkim białkiem tego rodzaju jest α -dystroglikan. Pewne dane wskazują na obecność podobnych oligosacharydów

także na ludzkiej gonadotropinie kosmówkowej i fibronektynie łożyska, a także mysiej tenascynie. Informacje w tym zakresie są jednak niepełne, a dla żadnego z wymienionych białek nie wykazano zdolności do wiązania lamininy, podstawowego ligandu α -dystroglikanu w macierzy zewnątrzkomórkowej [21, 39].

STRUKTURA DYSTROGLIKANU

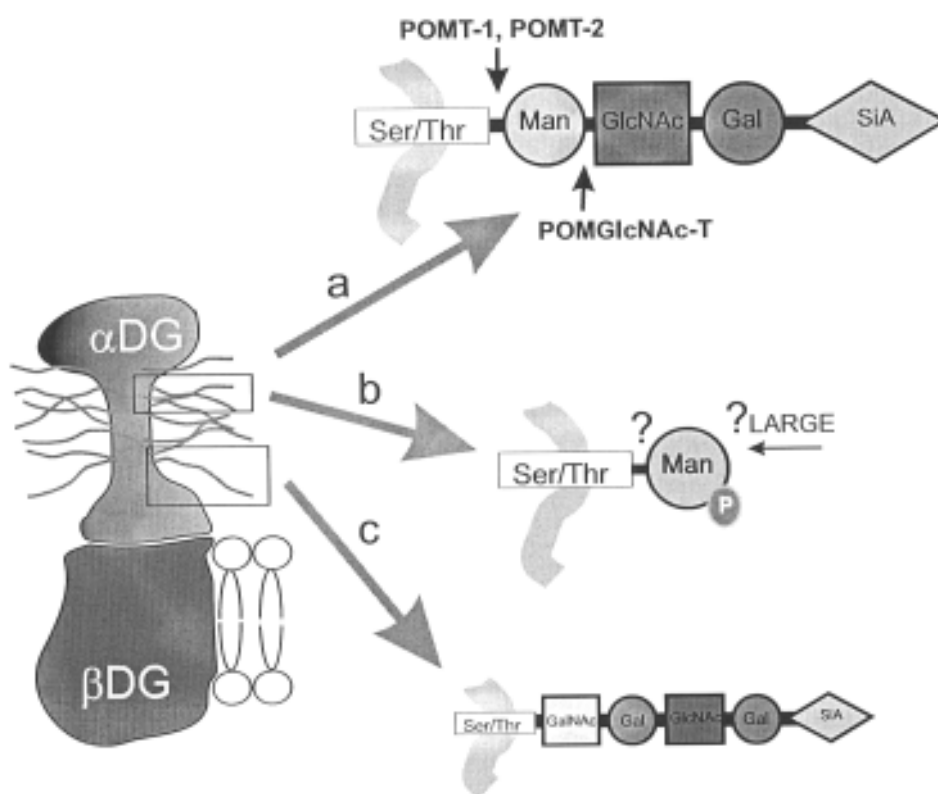
Dystroglikan jest centralnym białkiem kompleksu glikoprotein związanych z dystrofiną (DGC), odpowiedzialnym bezpośrednio za złożone oddziaływanie pomiędzy komórką mięśniową a jej zewnętrznym środowiskiem (ryc. 1). Jest on syntetyzo-



RYCINA 1. Kompleks glikoprotein związanych z dystrofiną i jego oddziaływanie w obrębie błony podstawnej. W skład kompleksu wchodzi sześć białek integralnych sarkolemmy: sarkoglikany α - δ , podjednostka β dystroglikanu (bezpośrednio łącząca się z dystrofiną) oraz spinający całość sarkospan. Alfa dystroglikan jest białkiem peryferyjnym. Z jego glikanami oddziaływać może laminina, a prawdopodobnie z częścią białkową proteoglikany – agryna i biglikan

FIGURE 1. Dystrophin - glycoprotein complex and its ligands in basal lamina. The complex is composed of six integral proteins: sarcoglycans α - δ , β -dystroglycan (bound directly to dystrophin) and sarcospan. Alpha-dystroglycan is a peripheral protein. Its glycan chains are responsible for laminin binding and the protein is suggested to interact with proteoglycans: agrin and biglycan

wany w komórce jako pojedyncze białko, a przed włączeniem w strukturę sarkolemy ulega proteolitycznemu rozcięciu na dwie podjednostki, określane jako dystroglikan α i β [1, 2, 15, 28]. Beta-DG jest niewielką (43 kDa) integralną glikoproteiną błonową, zawierającą w obrębie ektodomenu klasyczne łańcuchy N-glikanów. Podjednostka α jest peryferyjnie związana z powierzchnią błony poprzez ścisłą interakcję z siostrzaną podjednostką β . Przy masie łańcucha polipeptydowego rzędu 70 kDa faktyczna masa α DG wyznaczona elektroforetycznie jest blisko dwukrotnie większa, co jest wynikiem intensywnej glikozylacji. Przestrzenny kształt cząsteczki α -dystroglikanu opisywany jest jako przypominający hantle: dwie skrajne domeny globularne połączone są częścią kształtu pałeczkowatego (ryc. 2). Ten fragment cząsteczki zawiera znaczne ilości seryny i treoniny, aminokwasów stano-



RYCINA 2. Glikozylacja α -dystroglikanu: a – szlak O-mannozytacji, b – domniemane działanie glikozylotransferazy LARGE uwzględniające fosforylację mannozy, c – „klasyczny” O-glikan typu mucynowego (rdzeń typu I); czarne strzałki wskazują znane i proponowane miejsca działania glikozylotransferaz swoistych dla szlaku O-mannozytacji; Gal – galaktoza, Man – mannoza, GalNAc – N-acetylogalaktozamina, GlcNAc – N-acetyloglukozoamina, SiA – kwas sjałowy

FIGURE 2. Dystroglycan glycosylation: a – O-mannosylation, b – putative LARGE governed pathway with mannose phosphorylation, c – mucin type O-glycosylation; black arrows indicate known and proposed location of glycosyltransferase activity; Gal – galactose, Man – mannose, GalNAc – N-acetyl-galactosamine, GlcNAc – N-acetyl-glucosamine, SiA – sialic acid

wiących potencjalne miejsca O-glikozylacji [2, 15, 25]. Region ten jest faktycznie bardzo silnie uglikozylowany. Około połowy (do dwóch trzecich) łańcuchów cukrowych przyłączonych do α DG stanowią klasyczne O-glikany, w których pierwszym monosacharydem przyłączonym wiązaniem O-glikozydowym do łańcucha bocznego seryny lub treoniny jest GalNAc, a kolejnym galaktoza (rdzeń typu I). Do reszt asparaginy przyłączane są nieliczne łańcuchy N-glikanów. Pozostałe miejsca glikozylacji są nośnikami opisanych wyżej glikanów z mannozą na końcu redukującym. W przeciwieństwie do innych białek, które prawdopodobnie mogą podlegać tej modyfikacji, obfitość miejsc glikozylacji w mucynowej domenie α DG powoduje, że oligosacharydy tworzą klastry, w których gęstość skupionych epitopów umożliwia właściwe wiązanie ligandów [39].

Interesującą kwestią wydaje się określenie sekwencji zgodności determinujących rodzaj glikozylacji, a zatem różnicujących możliwość przyłączenia do grupy hydroksylowej Ser/Thr przez odpowiednie glikozylotransferazy N-acetylgalaktozoaminy bądź mannozy. Pierwsze doniesienia na ten temat wskazywały na możliwość preferencyjnego wiązania mannozy a nie GalNAc do Ser/Thr w obrębie dwóch 18-aminokwasowych syntetycznych peptydów o sekwencji fragmentów α DG [24]. Nowsze dane pokazują, że nawet tak duża sekwencja zgodności nie jest wystarczająca dla O-mannozytacji α DG *in vivo*. Według Breloy i wsp. [6] O-mannozytacja pojawia się na klastrach Ser/Thr lub pojedynczych resztach Thr otoczonych przez aminokwasy zasadowe, pod warunkiem obecności po stronie N-końcowej domeny mucynowej przylegającego do niej fragmentu peptydowego o długości aż 41 reszt aminokwasowych. Fragment ten jest konieczny i wystarczający do wywołania O-mannozytacji, a zmiany aminokwasów w obrębie jego struktury uniemożliwiają tego rodzaju modyfikację [6, 14]. GalNac-transferazy inicjujące syntezę mucynowych O-glikanów nie przyłączają cukru do miejsca glikozylacji w tym regionie.

ENZYMY SZLAKU O-MANNOZYLACJI ZWIĄZANE Z PATOMECHANIZMEM DYSTROFII MIĘŚNIOWYCH

Obecnie zidentyfikowano sześć genów, których produkty odpowiadają za właściwą glikozylację α DG. Są to geny *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT*, *FKT*, *FKRP* i *LARGE* [25, 28, 29]. Uszkodzenia w obrębie tych genów powodują dystroglukanopatie, do których zalicza się przede wszystkim zespół Warburga-Walkera – WWS [36]), dystrofię mięśniowo-oczno-mózgową (MEB [34]) oraz dystrofię mięśniową Fukuyamy (FCMD). Wspólną ich cechą jest fakt, że zanikowi mięśni towarzyszy znaczne obniżenie migracji neuronów, prowadzące do zaburzeń rozwoju umysłowego oraz dysfunkcje narządu wzroku, często związane z nieprawidłową strukturą siatkówki [10, 15, 27]. Nieprawidłową glikozylację dystroglukanu stwierdzono także w niektórych przypadkach LGMD, wtedy nie towarzyszy im zaburzenie rozwoju umysłowego i wzroku [32, 40].

Kluczową rolę w O-mannozytacji α DG odgrywają trzy unikalne enzymy: *POMT1*, *POMT2* i *POMGnT*. Gen *POMT1* koduje białko analogiczne do

mannozylotransferazy obecnej u drożdży, przyłączające mannozę wiązaniem O-glikozydowym do hydroksylowanej reszty seryny lub treoniny łańcucha polipeptydowego [21, 25]. Ekspresja i działanie proteiny O-mannozylo-transferazy 2 (produktu genu *POMT2*) w dużej mierze pokrywają się z właściwościami *POMT1*. Dla prawidłowej inicjacji O-mannozytacji niezbędna jest obecność i współdziałanie obu enzymów, aktywnych w formie kompleksu [38]. Większość mutacji w obrębie obu genów O-mannozylotransferaz wywołuje zespół Warburga-Walkera, dystrofię mięśniową o ciężkim przebiegu, dziedziczną w sposób autosomalny recesywny [16, 31, 38]. Dystrofii mięśni towarzyszą poważne dysfunkcje lub wręcz utrata wzroku oraz znaczne zahamowanie rozwoju umysłowego. Obecność mutacji w genach *POMT1* i *POMT2* rzadziej obserwuje się w przypadkach choroby o łagodniejszym przebiegu, MEB oraz LGMD [7, 25, 29]. Z drugiej strony, WWS może być wywołany również uszkodzeniami innych genów i ich produktów [8, 15, 37].

Gen *POMGnT* odpowiada za syntezę glikozylotransferazy przenoszącej GlcNAc z UDP-GlcNAc na hydroksylową grupę drugiego węgla mannozy. Ekspresja mRNA *POMGnT* jest szczególnie wysoka w mięśniach szkieletowych i mózgu. Niedobór aktywności enzymu odpowiada przede wszystkim za dystrofię mięśniowo-oczno-mózgową [25, 27, 34]. Choroba ma przebieg łagodniejszy niż WWS, ale także wiąże się z zaburzeniem rozwoju umysłowego i dysfunkcją wzroku.

BIAŁKA O NIEZIDENTYFIKOWANEJ FUNKCJI

Udział pozostałych trzech genów w patomechanizmach dystrofii mięśniowych został określony na podstawie badań genetycznych, m.in. wyciszenia odpowiednich genów u myszy. W żadnym z tych przypadków nie wyizolowano i nie określono precyzyjnie funkcji białka, będącego produktem danego genu [8, 13, 28].

Częstą dystroglikanopatią jest endemiczna dystrofia mięśniowa Fukuyamy (FCMD), dotycząca w głównej mierze populację japońską. Mutacje dotyczą białka nazwanego fukutyną. Na podstawie homologii domniemanej domeny katalitycznej do znanych enzymów sugeruje się, że białko to może być transferazą fosforylowanych cukrów [15]. Jedna z mutacji genu, która nie powoduje całkowitego braku białka, jest starą, ancestralną mutacją powszechną wśród ludności Japonii. Jej częstość występowania szacuje się na 3 przypadki na 1000 osób. Chorują recesywnie homozygoty, a przebieg choroby jest stosunkowo łagodny. Dużo ostrzejsze objawy obserwuje się u osobników, u których tej mutacji towarzyszy inna w genie allelicznym. Pod względem objawów klinicznych FCMD nie wyróżnia się spośród innych dystroglikanopatii: zniszczeniu tkanki mięśniowej towarzyszy zahamowanie rozwoju umysłowego i zaburzenia wzroku [15, 29]. Niedobór fukutyny może wywoływać także WWS [9] oraz dystrofię obręczowo-kończynową (LGMD) [32]. Dystroglikanopatie związane z mutacjami fukutyny coraz częściej obserwuje się także w innych populacjach [9, 41].

Niedobór białka spokrewnionego z fukutyną – FKRP (*fukutin related protein*) odpowiada za dwie kolejne jednostki chorobowe: wrodzoną dystrofię mięśniową typu

1C (CMD 1C) i dystrofię obręczowo-kończynową typu 2.1 (LGMD 2.1) [7, 8, 40]. Obecnie wiadomo, że może prowadzić także do cięższych postaci choroby, w tym WWS i MEB [7, 15, 34]. FKRP, zlokalizowane prawdopodobnie w cysternach aparatu Golgiego lub ER, jest homologiem fukutyny. Najsilniejszą ekspresję genu zaobserwowano w mięśniach szkieletowych, mięśniu sercowym i łożysku. Także w tym przypadku rola białka w glikozylacji α DG nie została poznana.

Faktyczna rola biochemiczna nie została dotychczas szczegółowo opisana także dla białka LARGE [13, 22, 37]. Białko to, będące produktem genu *LARGE*, uważa się za dwufunkcyjną glikozylotransferazę mającą dwie domeny katalityczne, obie niezbędne dla zachowania funkcji. Znaczenie genu pierwotnie wykazano dla mysich mutantów. Obecnie udowodniono związek mutacji w obrębie tego genu z objawami dystrofii mięśniowej różnych typów u kilku pacjentów [13, 22, 37]. Właściwości białka przewiduje się na podstawie homologii sekwencji. Uważa się, że białko zawiera N-kończową kotwicę transmembranową, fragment superhelikalny oraz domeny katalityczne podobne do glikozylotransferaz rodzin GT-8 i GT-49 [13]. Białka będącego produktem genu dotychczas nie wyizolowano. Niezwykle istotną i potwierdzoną przez wiele ośrodków obserwacją jest fakt, że białko LARGE wywołuje hiperglikozylację α DG. Mechanizm tego procesu nie jest znany. Sugeruje się, że na skutek działalności LARGE powstają odmienne glikany o niepoznanej dotychczas strukturze lub też nieznanne dotąd modyfikacje wcześniej istniejących glikanów [15, 28]. Co uderzające, ich obecność zapewnia prawidłowy kontakt α DG z ligandami, w tym lamininą, także w komórkach z potwierdzonym deficytem POMT lub POMGnT [3].

Nowe światło na udział prawdopodobnej glikozylotransferazy LARGE w tworzeniu struktury oligosacharydowej odpowiedzialnej za wiązanie lamininy rzucają prace Yoshida-Moriguchi i wsp. [42]. Autorzy pokazują, że O-mannozowe oligosacharydy α DG nie tracą zdolności wiązania lamininy na skutek usuwania kolejnych reszt cukrowych przy pomocy swoistych glikozydaz. Utratę funkcji rozpoznawania ligandu wywołuje natomiast trawienie glikanu kwasem fluorowodorowym, hydrolizujące wiązanie fosfodiesterowe. Obecność fosforylowanych glikanów wykazano w części natywnego α DG z mięśni szkieletowych królika. Reszta fosforanowa, odporna na działanie alkalicznych fosfataz, jest przyłączona wiązaniem fosfodiesterowym do C6 mannozy. Autorzy sugerują, iż glikozylotransferaza LARGE przenosi resztę cukrową na wydłużany glikan pod warunkiem wcześniejszej fosforylacji mannozy. Taka hipoteza pozostaje zgodna z wcześniejszymi sugestiami, że struktury budowane przy udziale LARGE są odmienne od opisanych wcześniej O-mannozyloowanych tetrasacharydów.

Unikalne oligosacharydy dystroglikanu są niezbędnym łącznikiem pomiędzy komórką a elementami macierzy zewnątrzkomórkowej [1, 2, 18]. W ten sposób dystrofie mięśniowe dołączyły do grupy schorzeń, których patomechanizm związany jest z nieprawidłową glikozylacją białka. Zewnątrzkomórkowymi ligandami α DG, oprócz łańcuchów α 1 i α 2 lamininy, są agryna, perlekan, biglikan i neureksyna, proteoglikany zawierające łańcuchy glikozoaminoglikanów [4, 5]. Brakuje danych doświadczalnych wyjaśniających mechanizm tej interakcji.

NADEKSPRESJA *LARGE* JAKO STRATEGIA TERAPEUTYCZNA

Wprowadzenie genu *LARGE* do komórek wykazujących nieprawidłową O-mannozylację w wektorach wirusowych skutkuje odtworzeniem glikozylacji α -dystroglikanu, w stopniu umożliwiającym jego interakcję z lamininą [3, 17]. Warto zwrócić uwagę, że w tym przypadku nawet niewielka ilość enzymu okazuje się skuteczna, gdyż nie samo białko odpowiada za właściwą strukturę połączeń komórki z ECM, a produkty jego enzymatycznej aktywności potranslacyjnie modyfikujące prawidłowo zsintetyzowane białko.

Wykazano, że indukowana nadekspresja *LARGE* w pierwotnych liniach komórkowych pacjentów z FCMD, MEB i WWS umożliwiła prawidłowe wiązanie lamininy [3, 17]. Kolejne badania wykazały efekt zahamowania rozwoju dystrofii mięśniowej u myszy w wyniku nadekspresji *LARGE*. Doświadczenia zarówno z wykorzystaniem myszy z wyciszonymi genami powodującymi dystrofię, jak i na liniach komórkowych wyprowadzonych od pacjentów z różnorodnymi dystroglikanopatiami sugerują, że gen *LARGE* jest w pewnym sensie nadrzędny w stosunku do innych powodujących defekty glikozylacji: transgeny są w stanie pokonać nie tylko endogenne deficyty genu *LARGE*, ale także wzmóc glikozylację w stopniu umożliwiającym wiązanie laminin i zachowanie właściwości tkanki także w przypadku defektów w obrębie pozostałych genów dystroglikanopatii: *POMT*, *POMGnT* i *FKT* [3, 15, 17, 27]. Nadekspresja *POMGnT* nie wywoływała takiego efektu. Wzmożenie glikozylacji obserwowano także u myszy typu dzikiego po wprowadzeniu dodatkowych kopii *LARGE*. Nadrzędny charakter modyfikacji glikanów wywołany przez białko *LARGE* trudno precyzyjnie wyjaśnić. Wymagania dotyczące fosforylacji O-wiązanej mannozy potwierdzają obecność modyfikacji glikanu swoistych dla szlaku kontrolowanego przez *LARGE*, jednak nie tłumaczą, w jaki sposób białko to może wywoływać hiperglikozylację α -dystroglikanu w przypadkach deficytów mannozylotransferaz *POMT-1* i *POMT-2*, a zatem w sytuacji, gdy mannoza w ogóle nie jest przyłączona do grup hydroksylowych seryny i treoniny białka. Z pewnością potrzebne są dalsze badania nad specyficznością *LARGE* i możliwością modyfikacji przy jego udziale potencjalnych innych niż mannoza fosforylowanych monosacharydów. Niezależnie od licznych nie wyjaśnionych dotychczas kwestii dotyczących szczegółowego przebiegu procesu glikozylacji wydaje się, że terapia genowa w tym przypadku stwarza szansę na znaczne zniwelowanie skutków klinicznych dystrofii mięśniowych związanych z zaburzeniami szlaku O-mannozylacji dystroglikanu.

PODSUMOWANIE

W kontekście badań dystrofii mięśniowych należy podkreślić znaczenie modyfikacji potranslacyjnej, jaką jest glikozylacja, dla prawidłowego funkcjonowania mięśnia. WWS, MEB i FMD wyznaczają całkowicie nowy obszar badań omawianej grupy chorób. Struktura oligosacharydów kluczowego białka sarkolemy – α DG okazała

się nietypowa dla komórek ssaków. Postuluje się obecność innych, ciągle nieopisanych szlaków syntezy glikanów lub ich nieznanymi dotychczas modyfikacji [15, 28, 29]. Kolejne badania donoszą o możliwym znaczeniu defektów na szlaku syntezy lipidowego nośnika reszt cukrowych, fosforanu dolicholu, które to defekty poniekąd łączą grupę dystrofii mięśniowych i wrodzonych niedoborów glikozylacji, gdyż defekt we wcześniejszym, wspólnym fragmencie szlaków metabolicznych będzie skutkował zablokowaniem dalszych etapów zarówno N-glikozylacji, jak i O-mannozytacji [11, 19]. Zainteresowanie zewnątrzkomórkowymi ligandami białek sarkolemy kieruje uwagę na proteoglikany: perlekan, agrynę i biglikan [4, 5]. Mechanizmy tych interakcji, ich znaczenie dla zachowania integralności sarkolemy a także potencjalny udział łańcuchów glikozoaminoglikanów w oddziaływaniach nie zostały dotychczas szczegółowo poznane. Te informacje wydają się szczególnie ważne w kontekście badań mających na celu opracowanie skutecznych terapii dla pacjentów cierpiących z powodu dystrofii mięśniowych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALLIKIAN MJ, MCNALLY EM. Processing and assembly of the dystrophin glycoprotein complex. *Traffic* 2007; **8**: 177–183.
- [2] BARRESI R, CAMPBELL KP. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci* 2006; **119**: 199–207.
- [3] BARRESI R, MICHELE DE, KANAGAWA M, HARPER HA, DOVICO SA, SATZ JS, MOORE SA, ZHANG W, SCHACHTER H, DUMANSKI JP, COHN RD, NISHINO I, CAMPBELL KP. LARGE can functionally bypass alpha-dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. *Nat Med* 2004; **10**: 696–703.
- [4] BLASI C, PEGORARO E, ANGELINI C, CISCATO P, PRELLE A, MANTEGAZZA R, MORANDI L, MORA M. Decorin and biglycan expression is differentially altered in several muscular dystrophies. *Brain* 2005; **128**: 2546–2555.
- [5] BRANDAN E, CABELLO-VERRUGIO C, VIAL C. Novel regulatory mechanisms for the proteoglycans decorin and biglycan during muscle formation and muscular dystrophy. *Matrix Biology* 2008; **27**: 700–708.
- [6] BRELOYI, SCHWIENTEK T, GRIES B, RAZAWI H, MACHT M, ALBERS C, HANISCH FG. Initiation of Mammalian O-Mannosylation *in Vivo* Is Independent of a Consensus Sequence and Controlled by Peptide Regions within and Upstream of the α -Dystroglycan Mucin Domain. *J Biol Chem* 2008; **283**: 18832–18840.
- [7] BUSHBY K. Diagnosis and management of the limb girdle muscular dystrophies. *Pract Neurol* 2009; **9**: 314–323.
- [8] CHAN YM, KERAMARIS-VRANTSIS E, LIDOV HG, NORTON JH, ZINCHENKO N, GRUBER HE, THRESHER R, BLAKE DJ, ASHAR J, ROSENFELD J, LU QL. Fukutin-related protein is essential for mouse muscle, brain and eye development and mutation recapitulates the wide clinical spectrums of dystroglycanopathies. *Hum Mol Genet* 2010; **19**: 3995–4006.
- [9] CHANG W, WINDER TL, LEDUC CA, SIMPSON LL, MILLAR WS, DUNGAN J, GINSBERG N, PLAGA S, MOORE SA, CHUNG WK. Founder Fukutin mutation causes Walker-Warburg syndrome in four Ashkenazi Jewish families. *Prenat Diagn* 2009; **29**: 560–569.
- [10] CLEMENT E, MERCURI E, GODFREY C, SMITH J, ROBB S, KINALI M, STRAUB V, BUSHBY K, MANZUR A, TALIM B, COWAN F, QUINLIVAN R, KLEIN A, LONGMAN C, MCWILLIAM R, TOPALOGLU H, MEIN R, ABBS S, NORTH K, BARKOVICH AJ, RUTHERFORD M, MUNTONI F. Brain involvement in muscular dystrophies with defective dystroglycan glycosylation. *Ann Neurol* 2008; **64**: 573–582.

- [11] DENECKE J, KRANZ C. Hypoglycosylation due to dolichol metabolism defects. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1792**: 888–895.
- [12] FREEZE HH. Congenital Disorders of Glycosylation: CDG-I, CDG-II, and beyond. *Curr Mol Med* 2007; **7**: 389–396.
- [13] GREWAL PK, MCLAUGHLAN JM, MOORE CJ, BROWNING CA, HEWITT JE. Characterization of the LARGE family of putative glycosyltransferases associated with dystroglycanopathies. *Glycobiology* 2005; **15**: 912–923.
- [14] HANISCH FG, BRELOY I. Protein-specific glycosylation: signal patches and cis-controlling peptidic elements. *Biol Chem* 2009; **390**: 619–626.
- [15] HEWITT JE. Abnormal glycosylation of dystroglycan in human genetic disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1792**: 853–861.
- [16] JAEKEN J, MATTHIJS G. Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007; **8**: 261–278.
- [17] KANAGAWA M, NISHIMOTO A, CHIYONOBU T, TAKEDA S, MIYAGOE-SUZUKI Y, WANG F, FUJIKAKE N, TANIGUCHI M, LU Z, TACHIKAWA M, NAGAI Y, TASHIRO F, MIYAZAKI J, TAJIMA Y, TAKEDA S, ENDO T, KOBAYASHI K, CAMPBELL KP, TODA T. Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. *Hum Mol Genet* 2009; **18**: 621–631.
- [18] KANAGAWA M, TODA T. The genetic and molecular basis of molecular dystrophy: roles of cell-matrix linkage in the pathogenesis. *J Hum Genet* 2006; **51**: 915–926.
- [19] LEFEBER DJ, SCHÖNBERGER J, MORAVA E, GUILLARD M, HUYBEN KM, VERRIJP K, GRAFAKOU O, EVANGELIOU A, PREIJERS FW, MANTA P, YILDIZ J, GRÜNEWALD S, SPILIOTI M, VAN DEN ELZEN C, KLEIN D, HESS D, ASHIDA H, HOFSTEENGE J, MAEDA Y, VAN DEN HEUVEL L, LAMMENS M, LEHLE L, WEVERS RA. Deficiency of Dol-P-Man synthase subunit DPM3 bridges the congenital disorders of glycosylation with the dystroglycanopathies. *Am J Hum Genet* 2009; **85**: 76–86.
- [20] LOMMEL M, STRAHL S. Protein O-mannosylation: Conserved from bacteria to humans. *Glycobiology* 2009; **19**: 816–828.
- [21] LOMMEL M, WILLER T, CRUCES J, STRAHL S. POMT1 is essential for protein O-mannosylation in mammals. *Methods Enzymol* 2010; **479**: 323–342.
- [22] LONGMAN C, BROCKINGTON M, TORELLI S, JIMENEZ-MALLEBRERA C, KENNEDY C, KHALIL N, FENG L, SARAN RK, VOIT T, MERLINI L, SEWRY CA, BROWN SC, MUNTONI F. Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 2853–2861.
- [23] LOVE DC, KRAUSE MW, HANOVER JA. O-GlcNAc cycling: emerging roles in development and epigenetics. *Semin Cell Dev Biol* 2010; **21**: 646–654.
- [24] MANYA H, SUZUKI T, AKASAKA-MANYA K, ISHIDA HK, MIZUNO M, SUZUKI Y, INAZU T, DOHMAE N, ENDO T. Regulation of mammalian protein O-mannosylation: preferential amino acid sequence for O-mannose modification. *J Biol Chem* 2007; **282**: 20200–20206.
- [25] MARTIN PT. Congenital muscular dystrophies involving the O-mannose pathway. *Curr Mol Med* 2007; **7**: 417–425.
- [26] MEINEN S, BARZAGHI P, LIN S, LOCHMÜLLER H, RUEGG MA. Linker molecules between laminins and dystroglycan ameliorate laminin-alpha2-deficient muscular dystrophy at all disease stages. *J Cell Biol* 2007; **176**: 979–993.
- [27] MENDELL JR, BOUÉ DR, MARTIN PT. The congenital muscular dystrophies: recent advances and molecular insights. *Pediatr Dev Pathol* 2006; **9**: 427–443.
- [28] MOORE CJ, HEWITT JE. Dystroglycan glycosylation and muscular dystrophy. *Glycoconj J* 2009; **26**: 349–357.
- [29] MUNTONI F, TORELLI S, BROCKINGTON M. Muscular dystrophies due to glycosylation defects. *Neurotherapeutics* 2008; **5**: 627–632.
- [30] NAKAMURA N, LYALIN D, PANIN VM. Protein O-mannosylation in animal development and physiology: from human disorders to *Drosophila* phenotypes. *Semin Cell Dev Biol* 2010; **21**: 622–630.
- [31] PRADOS B, PEÑA A, COTARELO RP, VALERO MC, CRUCES J. Expression of the murine Pomt1 gene in both the developing brain and adult muscle tissues and its relationship with clinical aspects of Walker-Warburg syndrome. *Am J Pathol* 2007; **170**: 1659–1668.

- [32] PUCKETT RL, MOORE SA, WINDER TL, WILLER T, ROMANSKY SG, COVAULT KK, CAMPBELL KP, ABDENUR JE. Further evidence of Fukutin mutations as a cause of childhood onset limb-girdle muscular dystrophy without mental retardation. *Neuromuscul Disord* 2009; **19**: 352–356.
- [33] SCHACHTER H, FREEZE HH. Glycosylation diseases: *quo vadis?* *Biochim Biophys Acta* 2009; **1792**: 925–930.
- [34] SHENOY AM, MARKOWITZ JA, BONNEMANN CG, KRISHNAMOORTHY K, BOSSLERAD, TSENG BS. Muscle-Eye-Brain Disease. *J Clin Neuromuscul Dis* 2010; **11**: 124–126.
- [35] TAKEUCHI H, HALTIWANGER RS. Role of glycosylation of Notch in development. *Semin Cell Dev Biol* 2010; **21**: 638–645.
- [36] VAJSAR J, SCHACHTER H. Walker-Warburg syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2006; **1**: 29.
- [37] VAN REEUWIJK J, GREWAL PK, SALIH MA, BELTRÁN-VALERO DE BERNABÉ D, MCLAUGHLAN JM, MICHIELSE CB, HERRMANN R, HEWITT JE, STEINBRECHER A, SEIDAHMED MZ, SHAHEED MM, ABOMELHAA, BRUNNER HG, VAN BOKHOVEN H, VOIT T. Intragenic deletion in the *LARGE* gene causes Walker-Warburg syndrome. *Hum Genet* 2007; **121**: 685–690.
- [38] VAN REEUWIJK J, JANSSEN M, VAN DEN ELZEN C, BELTRAN-VALERO DE BERNABÉ D, SABATELLI P, MERLINI L, BOON M, SCHEFFER H, BROCKINGTON M, MUNTONI F, HUYNEN MA, VERRIPS A, WALSH CA, BARTH PG, BRUNNER HG, VAN BOKHOVEN H. POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet* 2005; **42**: 907–912.
- [39] WILLER T, VALERO MC, TANNER W, CRUCES J, STRAHL S. O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr Opin Struct Biol* 2003; **13**: 621–630.
- [40] YAMAMOTO LU, VELLOSO FJ, LIMA BL, FOGAÇA LL, DE PAULA F, VIEIRA NM, ZATZ M, VAINZOF M. Muscle protein alterations in LGMD2I patients with different mutations in the Fukutin-related protein gene. *J Histochem Cytochem* 2008; **56**: 995–1001.
- [41] YIS U, UYANIK G, HECK PB, SMITKA M, NOBEL H, EBINGER F, DIRIK E, FENG L, KURUL SH, BROCKE K, UNALP A, OZER E, CAKMAKCI H, SEWRY C, CIRAK S, MUNTONI F, HEHR U, MORRIS-ROSENDAHL DJ. Fukutin mutations in non-Japanese patients with congenital muscular dystrophy: Less severe mutations predominate in patients with a non-Walker-Warburg phenotype. *Neuromuscul Disord* 2010 in press.
- [42] YOSHIDA-MORIGUCHI T, YU L, STALNAKER SH, DAVIS S, KUNZ S, MADSON M, OLDSTONE MB, SCHACHTER H, WELLS L, CAMPBELL KP. O-mannosyl phosphorylation of alpha-dystroglycan is required for laminin binding. *Science* 2010; **327**: 88–92.

Redaktor prowadzący – W Kilariski

Otrzymano: 02.12.2010 r.

Przyjęto: 11.01.2011 r.

Mirosława Ferens-Sieczkowska

Katedra Chemii i Immunochemii Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich

ul. O. Bujwida 44A; 50-035 Wrocław

e-mail: mferens@immchem.am.wroc.pl