

Glikozylacja białek – wprowadzenie w diagnostykę zaburzeń glikozylacji

dr n.med. Katarzyna Kuśmierska
Zakład Badań Przesiewowych i Diagnostyki Metabolicznej
Instytut Matki i Dziecka

GLIKOZYLACJA

- potranslacyjna modyfikacja białek polegająca na enzymatycznym wbudowywaniu węglowodanów do szkieletu białkowego
- część białek może ulegać odwracalnej glikozylacji – pojedyncza grupa cukrowa (N-acetyloglukozamina) przyłączana jest do reszty serynowej lub treoninowej
- reszta serynowa i treoninowa może być poddawana odwracalnej fosforylacji
- białka połączone z łańcuchem oligosacharydowym (glikanem) za pomocą wiązań kowalencyjnych – to glikoproteiny lub proteoglikany
- Glikolipidy – co najmniej jeden łańcuch węglowy przyłączany jest wiązaniem kowalencyjnym do lipidu



Glikoproteiny

➤ Pełnią funkcje:

- cząsteczek strukturalnych
- cząsteczek transportujących
- receptorów
- enzymów
- hormonów

➤ Biorą udział w:

- procesach odpornościowych
- oddziaływaniach międzykomórkowych
- oddziaływaniach pomiędzy określonymi węglowodanami

➤ Wpływają na:

- pofałdowanie struktury białkowej
- hemostazę (tworzenie zakrzepów)



Łańcuchy oligosacharydowe (glikany)

- Zawierają informację biologiczną, która różni się od informacji zakodowanej w sekwencji DNA i RNA
- Za glikozylację danego białka odpowiada wzorzec ekspresji glikozylotransferaz odpowiedzialnych za tworzenie glikoprotein
- Podstawowe funkcje łańcuchów węglowodanowych:
 - ✓ modyfikacja właściwości fizykochemicznych białek
 - ✓ ochrona przed proteolizą i usunięciem białek osocza przez wątrobę
 - ✓ przyłączanie białek pozakomórkowych do błony komórkowej oraz białek wewnątrzkomórkowych do organelli takich jak: retikulum endoplazmatyczne i aparat Golgiego
 - ✓ wpływają na przenoszenie (migrację), sortowanie i wydzielanie białek z komórki
 - ✓ wpływają na rozwój embrionalny i różnicowanie tkanek

łańcuchy oligosacharydowe (glikany)

- Informacje zawarta w sekwencji i połączenia cukrów w glikanach jest informacją **DRUGORZĘDOWĄ**
- Wzorzec glikozylacji danego białka wynika z ekspresji różnych glikozylotransferaz odpowiedzialnych za syntezę glikoprotein, z powinowactwa tych enzymów do węglowodanowych substratów i względnej dostępności różnych cukrów.
- Informacja kodowana w cukrach jest zaprogramowana w połączeniach pomiędzy łańcuchami glikanów a białkami lub innymi cząsteczkami.
- Interakcje wywołują zmiany aktywności komórek

Cukry proste

W łańcuchach oligosacharydowych glikoprotein znajduje się 7 cukrów prostych

Końcowym cukrem łańcucha oligosacharydowego jest kwas N-acetyloneuraminowy (NeuAc), który najczęściej przyłączany jest do reszty galaktozy lub N-acetylogalaktozaminy (GalNAc)

Monosacharydy

- **Galaktoza** – występuje w N-glikoproteinach jako ostatni sacharyd przyłączony do kwasu sialowego (NeuAc);
- **Gluukoza** – występuje podczas syntezy N-glikoprotein, zwykle nieobecna w dojrzałych glikoproteinach (niektóre czynniki krzepnięcia);
- **Mannoza** – główny sacharyd N-glikoprotein;
- **Kwas sialowy (N-acetyloneuraminowy)** – występuje często jako końcowy sacharyd w O i N – wiązań glikoproteinowych;
- **Fukoza** – występuje na zewnątrz łańcuchów N i O-glikoprotein lub wewnętrznie przyłączane do reszty GlcNAc, połączonej N-glikozydowo z asparaginą; może być związana wewnętrznie z grupą OH seryny (niektóre czynniki krzepnięcia)
- **N-acetylogalaktozamina (GalNAc)** – występuje w O i N – wiązanych glikoproteinach
- **N-acetyloglukozamina (GlcNAc)** – połączony z atomem azotu asparaginy łańcucha polipeptydowego N-wiązanych glikoproteinach.

Wiązanie glikozydowe łączące cząsteczki białkowe i węglowodanowe decyduje o klasyfikacji glikoprotein

- glikoproteiny mogą być połączone z monosacharydami, disacharydami, oligosacharydami, polisacharydami i ich pochodnymi:
- proteoglikany, glikoproteiny, które zawierają polisacharydy złożone głównie z aminocukrów (glikozaminoglikanów).
- glikopeptydy, cząsteczki złożone z węglowodanów połączonych z oligopeptydami utworzonymi przez aminokwasy w konformacji L/D.
- glikoaminokwasy, aminokwasy połączone z sacharydem za pomocą dowolnego typu wiązania kowalencyjnego.
- glikozyłowe aminokwasy aminokwasami połączone z częścią sacharydową wiązaniami O-, N-glikozydowymi.

W nomenklaturze białek glikozylowanych, przedrostki O-, N- i (C)- są używane do określenia, wiązania przez które cukry są przyłączone do łańcucha polipeptydowego.

Powstałe glikoproteiny są najczęściej białkami powierzchniowymi lub białkami układu wydzielniczego

- Pełen mechanizm syntezy glikoprotein zachodzi w retikulum endoplazmatycznym (ER) i aparacie Golgiego z wykorzystaniem enzymów odpowiedzialnych za procesy regulacyjne jak również tworzenie wiązań kowalencyjnych

białko + oligosacharyd

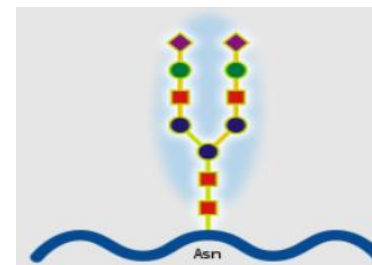
Zsyntetyzowany oligosacharyd jest przyłączany do reszty Asn zawartej w sekwencji peptydowej Asn-X-Ser/Thr podczas translacji białka przez grupę enzymów oligosacharylotransferazy (OST).

Trzy reszty Glc na końcu oligosacharydu służą jako sygnał do prawidłowej syntezy oligosacharydów i są cięte z jedną z reszt mannozy przed przeniesieniem do aparatu Golgiego do dalszej obróbki białka.

Część oligosacharydów może ulec modyfikacji przez dodanie galaktozy, kwasu sialowego, fukozy, co daje łańcuchy o znacznej różnorodności i złożoności.

Glikoproteiny

Reszty cukrowe dołączone są do:



N - grupy amidowej w bocznym łańcuchu asparaginy

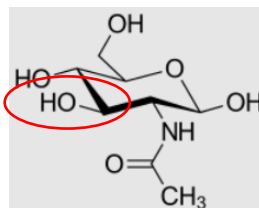
- N Asn-X-Ser, Asn-X-Thr

O – w bocznym łańcuchu seryny/treoniny

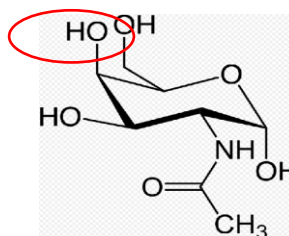
- O

Cukrem bezpośrednio połączonym do jednego z bocznych łańcuchów białka jest

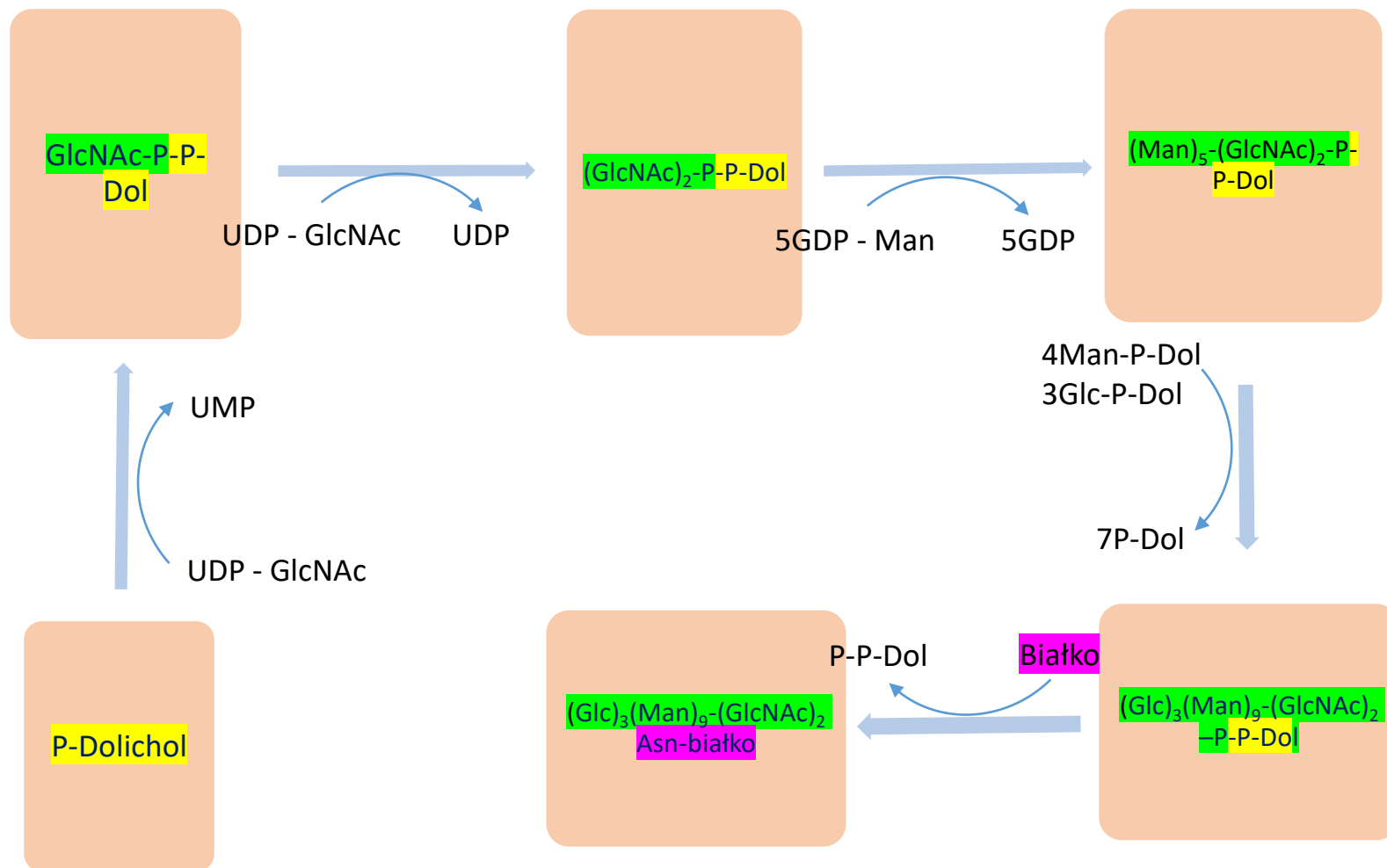
N-acetyloglukozoamina



N-acetylogalaktozoamina



Fosforan dolicholu – silnie hydrofobowy alkohol o długim łańcuchu lipidowym, którego końcowa grupa fosforanowa jest miejscem przyłączenia zaktywowanego oligosacharydu.



Cukry nukleotydowe

W reakcjach biochemicznych biorą udział cukry nukleotydowe

Większość cukrów nukleotydowych powstaje w cytoplazmie z nukleotydów trójfosforanowych

Reakcje glikozylacji zachodzą zarówno w cytoplazmie, ER jak i wewnątrz aparatu Golgi'ego a odpowiednie „systemy przekaźników” transportują cukry nukleotydowe przez błonę aparatu Golgi'ego

Układy transportowe:

UDP-Gal

GDP-Man

CMP-NeuAc

W aparacie Golgiego cukrowe reszty glikoprotein ulegają modyfikacjom

- Modyfikacje grup oligosacharydowych połączonych z białkiem wiązaniem O-glikozydowym polegają na odłączeniu jednych cukrów i przyłączeniu innych
- Modyfikacje grup oligosacharydowych połączonych wiązaniem N-glikozydowym polegają na przebudowywaniu tych grup.

Aparat Golgiego

Jest głównym ośrodkiem sortującym białka w komórce przy docelowym kierowaniu ich do Lizosomów, pęcherzyków sekrecyjnych i błony komórkowej.



Oligosacharydy

- Połączone wiązaniem N-glikozydowym zawierają wspólny pięciocukrowy rdzeń składający się z:
 - trzech cząsteczek mannozy
 - dwóch reszt N-acetylglukozaminy
- Pozostałe cukry przyłączane są do rdzenia w różny sposób, powodując dużą różnorodność oligosacharydów w glikoproteinach.
- Oligosacharydy typu *bogate w mannozę* reszty mannozy przyłączane są do rdzenia
- Oligosacharydy typu *złożone (complex type)* dobudowywane do rdzenia są różne kombinacje N-acetylogalaktozaminy, galaktozy, kwasu sialowego (pochodny mannozy) i reszt fukozy (pochodnej mannozy).

Różnorodność i złożoność jednostek węglowodanowych w glikoproteinach pokazuje jak ważną rolę odgrywają one w przekazie informacji i jak ważne pełnią funkcje.

DLACZEGO?

- cukry proste mogą być ze sobą połączone poprzez każdą z kilku grup hydroksylowych
- wiązanie przy C-1 może mieć konfigurację α lub β
- cukry mogą tworzyć struktury silnie rozgałęzione.

Dlaczego jest taka różnorodność?

- węglowodany są cząsteczkami bogatymi w informacje, kierującymi wieloma procesami biologicznymi

Układ nerwowy a łańcuchy oligosacharydowe?

- węglowodany na powierzchni komórek mogą służyć w kierowaniu procesem formowania złożonego zespołu połączeń nerwowych w mózgu.
- różnorodność węglowodanów w układzie nerwowym i ich selektywne rozmieszczenie pokazują, że są cząsteczkami bogatymi w informacje, która może być łatwo odczytywana przez białka receptorowe.

Odszyfrowanie kodu węglowodanowego będzie jednym z większych osiągnięć w historii medycyny.

Wrodzone zaburzenia glikozylacji (CDG) (ang. Congenital defects of glycosylation)

- grupa rzadkich wrodzonych zaburzeń metabolizmu,
- nieustannie powiększająca się rodzina obejmująca głównie autosomalnie recesywne zaburzenia wieloukładowe.

Glikozylacja jest złożonym procesem biologicznym obejmującym wiele ścieżek, na każdej z nich może dojść do uszkodzenia.

Do tej pory zidentyfikowano ok. 100 zaburzeń. Są one podzielone na defekty:

- N-glikozylacji białka,
- O-glikozylacji białek,
- glikozylacji lipidów,
- glikozylacji zakotwiczonego GDP oraz liczne zaburzenia N,O-glikozylacji



Zaburzenia glikozylacji

- Zaburzenia glikozylacji odróżniane są od wrodzonych zaburzeń deglikozylacji (CDDG) - deficyt NGLY1 oraz lizosomalnych chorób spichrzeniowych
- Heterogenność CDG i ich znaczna liczba >100 stanowi poważne wyzwanie diagnostyczne zarówno dla biochemików jak i klinicystów

CDG

„prawie cała medycyna w jednej pigułce”

CDG – zaburzenia, które mogą dotyczyć prawie wszystkich organów, oraz mogą dawać bardzo szerokie spektrum objawów klinicznych

CDG – ZABURZENIA WIELOUKŁADOWE



Zaburzenia glikozylacji

- mają bardzo szeroki zakres objawów klinicznych, które mogą obejmować wiele narządów o szerokim stopniu nasilenia objawów, co utrudnia wstępną ocenę kliniczną.
- najczęstsza forma CDG wynika przede wszystkim z defektów w genie fosfomannomutazy 2, określana jako PMM2-CDG (dawniej CDG1a), który zakłóca wczesne etapy składania glikanów i przyłączania glikanów do białek, co powoduje całkowity brak N-połączonych glikanów.
- zaburzenia CDG typu II są wynikiem wadliwej przebudowy glikanów powodującej skrócenie i nieprawidłowe działanie struktury niektórych glikanów (mikroheterogeniczność).
- CDG-II powodują mutacje znajdujące się w genach należących do aparatu Golgiego.

O-glikozylacja

- jest procesem, który pod względem diagnostycznym jest jeszcze bardziej złożony niż N-glikozylacja,
- powoduje bardzo szerokie spektrum objawów klinicznych,
- jednym z zaburzeń O-glikozylacji CDG są: dystroglikanopatie,
- wiele z opisanych mutacji dystrofii mięśniowej wpływa na szlaki biosyntezy O-glikozylacji α -dystroglikanu i nowych wykrywanych podtypów CDG

Defekty glikozylacji białek

- ✓ **deficyt fosfomannomutazy 2 (PMM2-CDG) (CDG Ia)** (Jaeken et al. 1980r) – najczęstsza wada w zaburzeniach N-glikozylacji białka (> 600 pacjentów opisanych na świecie)

Objawy kliniczne: łagodne do ciężkich zaburzenia neurologiczne ze zmiennym zaangażowaniem wielu innych narządów, charakterystyczna dysmorfia tj. nieprawidłowa tkanka tłuszczowa lub niespecyficzna.

- **Deficyt glukozylotransferazy 1 (ALG6-CDG) (CDG Ic)** – druga najczęstsza wada w zaburzeniach N-glikozylacji białka (opisanych >37 pacjentów)

Objawy kliniczne: łagodne do średnich zaburzenia neurologiczne

- **Deficyt fosfomannoizomerazy (MPI-CDG) (CDG Ib)**

Objawy kliniczne: tylko objawy wątrobowo-jelitowe; możliwość zastosowania leczenia doustną mannozą.

Defekty N-glikozylacji białek

- Deficyt mannozylotransferazy (6 defectów) – ALG1-CDG, ALG3-CDG, ALG(4-5)-CDG, ALG(7-9)-CDG
- Deficyt glukozylotransferazy (2 defekty) – (ALG2-CDG)
- Deficyt UDP-GlcNAc:Dol-P-GlcNAc-P transferazy (DPAGT1-CDG)
- Deficyt N-acetyloglukozaminylotransferazy (MGAT2-CDG)
- Deficyt glukozydazy 1 (GCS1-CDG)
- Deficyt podjednostki TUSC3 oligosacharylotransferazy (TUSC3-CDG)
- Deficyt transportera magnezowego 1 (MAGT1-CDG)



Podstawowe metody wykorzystywane do wykrywania zaburzeń N-glikozylacji oparte są na analizie izoform transferyny w surowicy:

IEF – metoda izoelektroogniskowania – możliwość frakcjonowania białek z wykorzystaniem ich punktu izoelektrycznego pI za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym.

Dostępność testów „przesiewowych” obejmujących analizę izoform transferyny metodą IEF umożliwia łatwe rozpoznawanie zaburzeń N-glikozylacji

Najważniejsze w diagnostyce zaburzeń glikozylacji jest określenie budowy łańcuchów glikanowych w oczyszczonej cząsteczce glikoproteiny i do tego służą techniki:

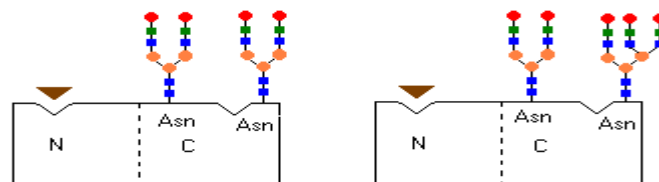
1. Wysokorozdzielczej spektrometrii mas
2. Wysokorozdzielczej spektroskopii rezonansu magnetyczno-jądrowego
3. Mikromacierzy glikanów

Doskonalenie technik ma na celu określenie poszczególnych cukrów i ich sekwencji w łańcuchach oraz wiązań glikozydowych

Diagnostyka laboratoryjna CDG

Izoformy transferyny surowicy oznaczane metodą elektroogniskowania

W prawidłowej transferynie przeważa izoforma z dwoma N-glikanami typu złożonego, zakończonymi czterema resztami kwasu siałowego



Ryc. 1. Schemat budowy cząsteczek transferyny z dwoma N-glikanami typu złożonego, które przyłączone są do asparagin domeny C - końcowej polipeptydu.
Po stronie lewej - tetra-siałotransferyna z dwoma, dwuantenowymi glikanami,
po prawej - penta-siałotransferyna z jednym dwu- i jednym trójanenowym glikanem.
▲ = atom żelaza ■ = N-acetyloglukozamina ● = mannoza ■ = galaktoza
● = kwas siałowy Asn = reszta asparaginy

Dr n.med. Maciej Adamowicz

Profil izoform transferyny

- Prawidłowy obraz izoform transferyny: dwa dwuantenowe glikany przyłączone do reszty asparaginowej z czterema resztami kwasu sialowego
- Typ I nieprawidłowych izoform transferyny: zmniejszenie tetrasialotransferyny i wzrost asialotransferyny i disialotransferyny. Wzór izoform transferyny wskazuje na defekt w przyłączaniu i transporcie glikanu związanego z dolicholem (w cytozol/RE)
- Typ II nieprawidłowych izoform transferyny: zwiększone frakcje trisialo, disialo- i monosialotransferyny z powodu włączenia skróconych lub monoantenowych łańcuchów cukrowych; defekty w końcowej części szlaku (wskazuje na defekt przemian po przeniesieniu glikanu do RE lub podczas glikozylacji w ap. Golgiego)

DEFEKTY GLIKOZYLACJI wykrywane w analizie izoform transferyny

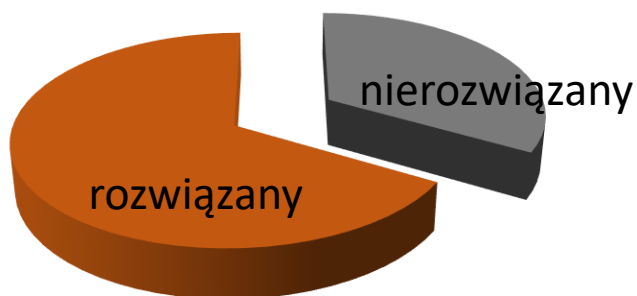
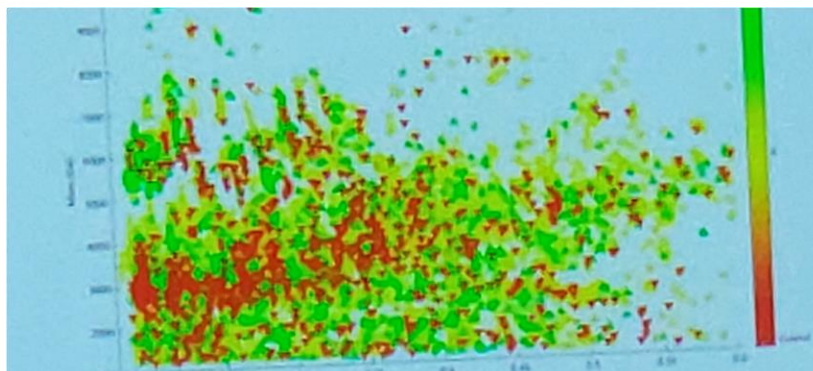
- defekty syntezy aktywnej mannozy (GDP-Man)
- defekty syntezy fosforanu dolicholu
- defekty syntezy pierwotnego oligosacharydu (LLO)
- defekty „obróbki” glikanu związanego z białkiem w ap.Golgiego
- defekty podjednostek kompleksu COG
- defekty podjednostek V-ATP-az



- W ostatnich latach zidentyfikowano bardziej złożone mechanizmy leżące u podstaw nieprawidłowej N-glikozylacji, związanej z aparatem Golgiego i transportem pęcherzykowym
- W przeciwieństwie do zaburzeń N-glikozylacji identyfikacja zaburzeń O-glikozylacji jest nadal bardzo dużym wyzwaniem
- Złożoność O-glikozylacji uniemożliwia zastosowanie testu skriningowego „elektroogniskowania”



Perspektywy diagnostyczne



- ✓ Poprawa diagnostyki CDG
- ✓ Monitorowanie leczenia
- ✓ Odkrywanie nowych genów
- ✓ Patofizjologia

