

Dědičné poruchy glykosylace: alfa-dystroglykanopatie

Zdražilová L., Ondrušková N., Honzík T., Hansíková H.

Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch, Klinika dětského a dorostového lékařství, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, Ke Karlovu 2, Praha 2, 128 08, Česká republika

SOUHRN

Alfa-dystroglykanopatie jsou vzácná dědičná onemocnění patřící do skupiny dědičných poruch glykosylace a díky svým klinickým příznakům spadají i do skupiny kongenitálních svalových dystrofií. Jsou způsobeny deficitem v glykosylaci mucinové domény proteinu alfa-dystroglykanu, což má za následek snížení afinity tohoto proteinu k lamininové G-doméně ligandů extracelulárního matrixu. Alfa-dystroglykan je nejvíce zastoupen ve svalcích, ale vyskytuje se i v nervových buňkách, očích, epitheliích a dalších orgánech a tkáních. Nejčastějšími klinickými příznaky alfa-dystroglykanopatií jsou svalová dystrofie, porucha centrální nervové soustavy a periferního nervstva a oční malformace. V dnešní době je známo okolo 20 genů, jejichž mutace vedou k těmto onemocněním.

Klíčová slova: alfa-dystroglykan, alfa-dystroglykanopatie, dědičné poruchy glykosylace.

SUMMARY

Zdražilová L., Ondrušková N., Honzík T., Hansíková H.: Congenital disorders of glycosylation: alpha-dystroglycanopathies

Alpha-dystroglycanopathies are rare inherited diseases that belong to the group of congenital disorders of glycosylation, and due to their clinical symptoms they also fall into the category of hereditary muscular dystrophies. They are caused by deficient glycosylation of alpha-dystroglycan's mucin domain, resulting in reduced affinity of this protein to the laminin G-domain of extracellular matrix ligands. Alpha-dystroglycan is most represented in muscles, but it is also expressed in nerve cells, eyes, epithelium and other organs and tissues. The most common forms of alpha-dystroglycanopathies manifest with muscular dystrophy, ocular malformations and defects of central nervous system. To this date, mutations in about 20 different genes have been described to cause alpha-dystroglycanopathies.

Keywords: alpha-dystroglycan, alpha-dystroglycanopathy, congenital disorders of glycosylation.

Úvod

Dědičné poruchy glykosylace (CDG, z anglického "Congenital disorders of glycosylation") jsou vzácná dědičná většinou autosomálně recesivní onemocnění, která jsou způsobena poruchami téměř všech kroků glykosylační dráhy od biosyntézy glykosylačních substrátů až po proteinový transport v Golgiho aparátu. V dnešní době je známo přes 100 genů [1], jejichž mutace vedou k těmto onemocněním a tento seznam nadále roste. Vzhledem k široké distribuci glykoproteinů a glykolipidů v lidském organismu je i spektrum klinických příznaků široké a zahrnuje poruchy téměř všech tkání a orgánů. Tato onemocnění jsou dále rozdělena do menších skupin podle typu glykosylace, která se rozlišuje podle způsobu navázání oligosacharidového řetězce na daný protein či lipid. Jedná se o *N*-glykosylaci navázanou před amidovou skupinu asparaginu a *O*-glykosylaci navázanou přes hydroxylovou skupinu serinu nebo threoninu. Alfa-dystroglykanopatie (α -DGP) jsou skupina dědičných onemocnění, která se také řadí do skupiny dědičných poruch glykosylace, a to konkrétně do poruch *O*-glykosylace.

Dystroglykan

Transmembránový protein dystroglykan je nejvíce zastoupen v kosterním svalstvu, ale je i součástí dal-

ších orgánů a tkání, jako např. epithelií, očí a nervové tkáně. Je kódován genem *DAG1* [MIM 128239] [1], který je umístěn na 3. lidském chromozomu [2]. Jeho sekvence se skládá ze dvou kódujících exonů rozdělených dlouhým intronem [2]. Dystroglykan je posttranslačně rozštěpen na proteiny alfa-dystroglykan (α -DG) a beta-dystroglykan (β -DG), které jsou na sebe navázány nekovalentně (viz obr. 1) [3].

Alfa-dystroglykan

Tento protein obsahuje dvě globulární domény, které jsou propojeny centrální mucinovou doménou [4] (obr. 2). Tato doména je bohatá na serinové a threoninové zbytky, které mohou být dále ve velké míře *O*-glykosylovány. Predikovaná molekulová hmotnost proteinového jádra α -DG je 72 kDa [3], ale díky své rozsáhlé posttranslační glykosylaci je jeho výsledná molekulová hmotnost mnohem vyšší a pohybuje se okolo 120 kDa v mozku a 156 kDa v kosterním svalstvu [5]. Posttranslační glykosylace tohoto proteinu je tkáňově specifická.

Hlavní funkcí tohoto proteinu je vytvořit vazby s určitými ligandy extracelulárního matrix [6], a to pomocí oligosacharidových zbytků napojených *O*-glykosidickou vazbou přes mannosu, čímž udává strukturální stabilitu daných buněk. Ve svalových buňkách tak zajišťuje jakousi

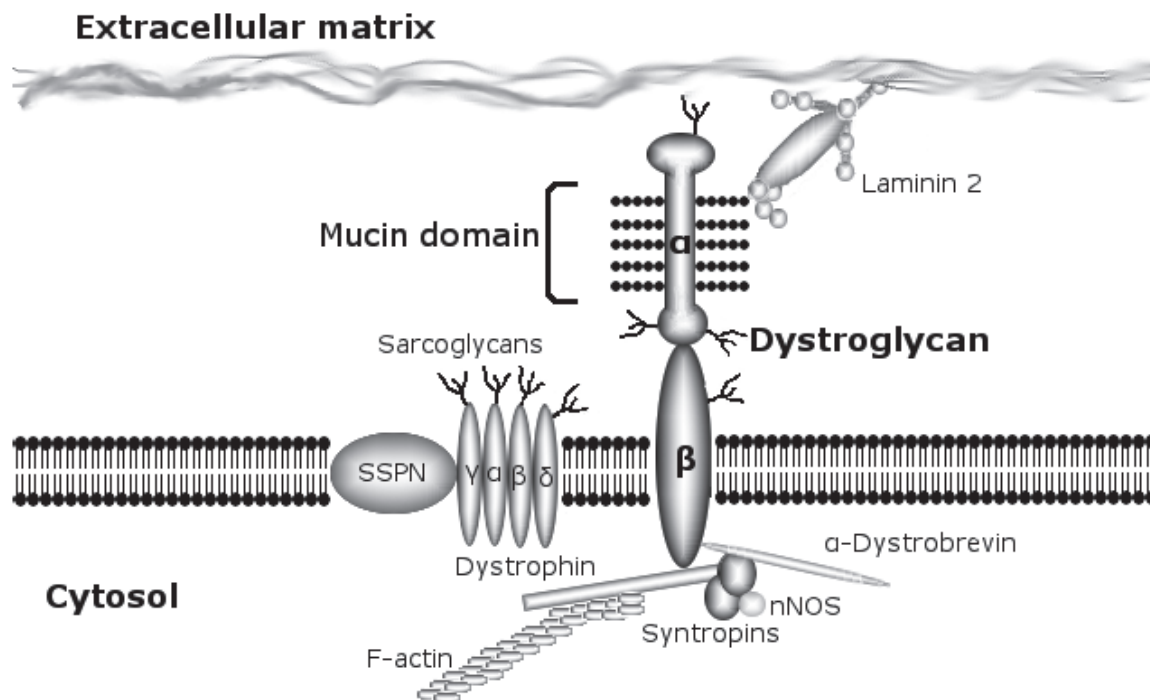


Fig. 1. Dystrophin-glycoprotein complex in muscle and its ligands. α -DG oligosaccharide chains binds laminin G domain in extracellular matrix. β -DG is transmembrane protein and binds dystrophin in cytosol. nNOS- NO synthase proteins, SSPN- Sarcospan.

pevnost svalových vláken při svalovém stahu díky navázání na proteiny laminin, agrin a perlecan [7], v nervových buňkách ovlivňuje jejich funkci, strukturu a vývoj díky interakci s neurexinem, pikachurinem [8] a v očích je důležitý pro fotoreceptorovou signalizaci, a to díky interakci α -DG s ligandem pikachurinem [9]. Na α -DG je navázán transmembránový protein β -DG, který zajišťuje svoji intracelulární doménou vazbu na dystrofin [9].

Posttranslační modifikace alfa-dystroglykanu

α -DG je posttranslačně velmi hojně glykosylován. V současné době jsou na jeho povrchu známá tři *N*-glykosylační místa, na kterých se napojuje oligosacharidový řetězec přes *N*-acetylglukosamin [10]. Na jeho mucinové doméně je zatím známo deset *O*-glykosylačních míst, kam se váží oligosacharidové řetězce hlavně přes mannosu a dva jsou napojeny přes *N*-acetylgalaktosamin [10].

O-vázaná glykosylace alfa-dystroglykanu

Všechny *O*-glykosidicky vázané oligosacharidové řetězce přes mannosu jsou funkčně důležité pro navázání na lamininovou *G*-doménu daných ligandů extracelulárního matrix [11]. Posttranslační *O*-glykosylace začíná navázáním mannosy na α -DG v endoplasmatickém retikulu pomocí enzymů protein *O*-mannosyl-

transferázy 1 a 2 (kódované geny *POMT1* a *POMT2*) [12]. Dalším krokem je navázání *N*-acetylglukosaminu na mannosu a to vazbou β -1,2 pomocí enzymu protein *O*-mannosa- β 1,2-*N*-acetylglukosaminyltransferázy 1 (kódován genem *POMGNT1*) nebo vazbou β -1,4 pomocí enzymu protein *O*-mannosa β 1,4-*N*-acetylglukosaminyltransferázy 2 (kódován genem *POMGNT2*) [3]. Následující kroky biosyntézy těchto oligosacharidových řetězců jsou velmi rozmanité a některé doposud nejsou popsány. Dalšími důležitými enzymy jsou také glykosyltransferázy kódované geny *FKTN* a *FKRP*, které přenáší ribitol-5-fosfát na vznikající oligosacharidový řetězec [14].

Alfa-dystroglykanopatie

Alfa-dystroglykanopatie jsou vzácná dědičná onemocnění, která patří do skupiny dědičných poruch glykosylace a zároveň do skupiny dědičných svalových dystrofií. Jsou to autosomálně recesivně dědičná onemocnění s rozmanitými klinickými příznaky a tedy i variabilními stupni klinické závažnosti [15]. Hlavními příznaky jsou svalová dystrofie, poruchy centrální nervové soustavy a zraku [16]. Dají se rozdělit na primární, sekundární a terciární alfa-dystroglykanopatie. Primární α -DGP jsou způsobené mutací v genu *DAG1* kódujícím přímo dystroglykan (DG) [17]. Sekundární skupina je nejrozšířenější a řadí se do ní poruchy enzymů zapojujících se do samotné glykosylace [18] a do terciární skupiny patří defekty v syntéze sacharidových donorů účastnících se posttranslační glykosylace α -DG [19].

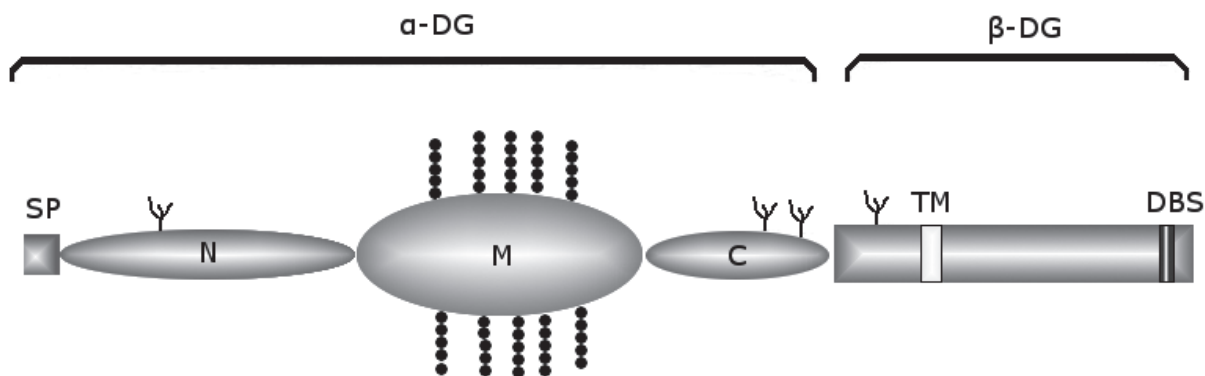


Fig. 2. Dystroglycan domain organization. α -DG binds noncovalently at β -DG. α -DG has a signal peptide (SP), *N*-terminal domain with one *N*-linked sugar (N), mucin domain (M) with extensive *O*-glycosylation (circles indicates *O*-linked sugar) and on the right side has *C*-terminal domain with two *N*-linked sugars. β -DG has one *N*-linked sugar, transmembrane domain (TM) and dystrophin binding site (DBS).

V současné době je známo okolo 20 genů (seznam viz Tabulka 1), jejichž mutace vedou k těmto onemocněním. Incidence je zatím neznámá.

Diagnostika alfa-dystroglykanopatií

Diagnostická analýza je založena na kombinaci podrobného klinického popisu, biochemických nálezů a molekulárně genetických analýz. Mezi nejzávažnější α -DGP patří Walker-Warburgův syndrom (z angl. „Walker-Warburg syndrome”, WWS) [21], kterému ve většině případů pacient podlehnou do věku tří let. Jedná se o velice závažnou svalovou dystrofii spojenou s abnormální oční a mozkovou

strukturou a intelektuální zaostalostí. Dalšími syndromy jsou pak „Muscle-Eye-Brain“ syndrom (z angl. „Muscle-Eye-Brain syndrome”, MEB), Fukuyamova kongenitální svalová dystrofie (z angl. „Fukuyama congenital muscular dystrophy”, FCMD) [15] a některé typy pletencové svalové dystrofie (z angl. „Limb-girdle muscular dystrophy”, LGMD) [22], vyznačující se svalovou dystrofií, hypotonií a ve většině případů i intelektuálním deficitem. Je velice těžké definovat genotyp-fenotypovou korelaci, neboť mutace v jednom genu může vést k téměř jakémukoli fenotypovému znaku. K určení diagnózy je vhodné provedení biochemické analýzy, která může nasměrovat vyšetřování ke konkrétnímu genu, paralelně s molekulárně-genetickou analýzou.

Table. 1. Summary of genes whose mutations cause alpha-dystroglycanopathy. Genes, whose mutations cause primary α -DGP are shown with white background, secondary α -DGP with light grey and tertiary α -DGP with dark grey colour. Adjusted by [20].

GENE	Function of the encoded protein
POMT1	protein <i>O</i> -mannosyltransferase 1
POMT2	protein <i>O</i> -mannosyltransferase 2
POMGNT1	protein <i>O</i> -linked mannose beta-1,2- <i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase 1
POMGNT2	protein <i>O</i> -linked mannose beta-1,4- <i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase 2
FKTN	transfer of ribitol-5-phosphate
FKRP	transfer of ribitol-5-phosphate
DPM1	dolichyl-phosphatemannosyltransferase subunit 1
DPM2	dolichyl-phosphatemannosyltransferase subunit 2
DPM3	dolichyl-phosphatemannosyltransferase subunit 3
DOLK	dolichol kinase
ISPD	CDP-ribitol synthesis
B3GALNT2	beta-1,3- <i>N</i> -acetylgalactosaminyltransferase 2
TMEM5	putative glycosyltransferase
B3GNT1	beta-1,3- <i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase 1
GMPPB	GDP-mannosepyrophosphorylase B
POMK	protein <i>O</i> -mannose kinase
DAG1	dystroglycan
MPDU1	protein mannose-phosphate-dolichol utilization 1
LARGE	xylosyltransferase, glucuronyltransferase

Současné možnosti laboratorní diagnostiky alfa-dystroglykanopatií

V dnešní době je biochemická diagnostika CDG založena na více metodách postupně zužujících výběr kandidátních genů. Prvním krokem je selektivní screening, v rámci něhož je detekována hypoglykosylace markerů, tedy vybraných sérových glykoproteinů. Tyto analýzy však mohou zachytit pouze část typů poruch glykosylace. Jsou to metody isoelektrické fokusace transferinu v séru detekující poruchy v *N*-glykosylaci a isoelektrické fokusace apolipoproteinu C-III detekující poruchy *O*-glykosylace přes *N*-acetylglaktosamin. Tyto metody však umožňují odhalit jen malou podskupinu α -DGP (např. deficit podjednotek dolichyl-fosfát-mannosasyntázy v důsledku mutací v genech DPM1-3). Pro diagnostiku α -DGP jsou nejčastěji používány metody Western Blot a imunohistochemie ve svalu, které jsou založeny na schopnosti vazby protilátky IIH6C4 proti specifickému epitopu oligosacharidového řetězce na α -DG [15]. Novou alternativou je použití průtokové cytometrie, kterou lze provádět i ve fibroblastech pacientů [15]. Za účelem definitivního potvrzení diagnózy jsou pak prováděny molekulárně-genetické analýzy, často s využitím metody „Next-generation sequencing“. V případě nalezení nových mutací s neznámým dopadem v genech zodpovědných za α -DG mohou být pak biochemické metody využity i k ověření patogenicity nalezených variant.

Závěr

α -DGP jsou vzácná onemocnění s rozsáhlou škálou klinických příznaků, která jsou způsobena sníženou *O*-glykosylací vázanou přes mannosu na mucinové doméne proteinu alfa-dystroglykanu. Jedná se o onemocnění, která doposud nebyla plně prozkoumána a pro která zatím neexistuje žádný účinný lék. Správné a včasné určení diagnózy je nezbytné pro genetické poradenství v postižených rodinách.

Seznam zkratk

CDG	dědičné poruchy glykosylace (z angl. Congenital disorders of glycosylation)
DG	dystroglykan
DAG1	gen kódující dystroglykan
α -DG	alfa-dystroglykan
β -DG	beta-dystroglykan
α -DGP	alfa-dystroglykanopatie
kDa	kilo Dalton
WWS	Walker-Warburgův syndrom (z angl. „Walker-Warburg syndrome“)
LGMD	Pletencová svalová dystrofie (z angl. „Limb-girdle muscle dystrophy“)
FCMD	Fukuyamova kongenitální svalová dystrofie (z angl. „Fukuyama congenital muscular dystrophy“)
FKRP	enzym „Fukutin related protein“
FKTN	fukutin
POMT1	gen kódující enzym protein <i>O</i> -mannosyltransferáza 1

POMT2	gen kódující enzym protein <i>O</i> -mannosyltransferáza 2
POMGNT1	gen kódující enzym protein <i>O</i> -mannosa- β 1,2- <i>N</i> acetylglukosaminylntransferáza 1
POMGNT2	gen kódující enzym protein <i>O</i> -mannosa- β 1,4- <i>N</i> acetylglukosaminylntransferáza 2
MEB	„Muscle-Eye-Brain“ syndrom (z angl. „Muscle-Eye-Brain syndrome“)

Literatura

1. **Freeze, H. H., Chong, J. X., Bamshad, M. J., Ng, B.G.** Solving glycosylation disorders: Fundamental approaches reveal complicated pathways. *Am. J Hum. Genet.*, 2014, 94 (2), p. 161-175
2. **Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Milatovich, A., Ozcelik T. et al.** Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum. Mol. genet.*, 1993, 2 (10), p. 1651-1657.
3. **Ibraghimov-Besrovnaya, O., Ervasti, J. M., Leveille, C. J., Slaughter, C. A., Sernett, S. W., Campbell, K. P.** Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, 1992, 355, p. 696-702.
4. **Brancaccio, A., Schulthess, T., Gesemann, M., Engel, J.** Electron microscopic evidence for a mucin-like region in chick muscle α -dystroglycan. *FEBS Lett.*, 1995, 368 (1), p. 139-142.
5. **Ervasti, J. M., Campbell, K. P.** Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell.*, 1991, 66 (6), p. 1121-1131.
6. **Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., Davies, K. E.** Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol. Rev.*, 2002, 82 (2), p. 291-329.
7. **Bowe, M. A., Deyst, K. A., Leszyk, J. D., Fallon, J. R.** Identification and purification of an agrin receptor from Torpedo postsynaptic membranes: a heteromeric complex related to the dystroglycans. *Neuron*, 1994, 12 (5), p. 1173-1180.
8. **Saito, F., Moore, S. A., Barresi, R. et al.** Unique role of dystroglycan in peripheral nerve myelination, nodal structure, and sodium channel stabilization. *Neuron*, 2003, 38 (5), p. 747-758.
9. **Winder, S. J.** The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem. Sci.*, 2001, 26 (2), p. 118-124.
10. UniProt [Online], [Citace: 21. 2 2016.], Dostupný na [www: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q14118>](http://www.uniprot.org/uniprot/Q14118)
11. **Chiba, A. K., Matsumura, H., Yamada, T. et al.** Structures of sialylated *O*-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve α -dystroglycan. The role of a novel *O*-mannosyl-type oligosaccharide in binding of α -dystroglycan with laminin. *J Biol. Chem.*, 1997, 272 (4), p. 2156-2162.
12. **Willer, T., Valero, M. C., Tanner, W., Cruces, J., Strahl, S.** *O*-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2003, 13 (5), p. 621-630.
13. **Live, D., Wells, L., Boons, G. J.** Dissecting the Molecular Basis of the Role of the *O*-Mannosylation Pathway in Disease: α -Dystroglycan and Forms of Muscular Dystrophy. *ChemBiochem*, 2013, 14 (18), p. 2392-2402.
14. **Kanagawa, M., Kobayashi, K., Tajiri, M. et al.** Identification of a Post-translational Modification with Ribitol-Phosphate and Its Defect in Muscular Dystrophy, *Cell Rep.*, 2016, 14 (9), p. 2209-2223.

15. **Stevens, E., Torelli, S., Feng, L. et al.** Flow cytometry for the analysis of α -dystroglycan glycosylation in fibroblasts from patients with dystroglycanopathies. *PLoS ONE.*, 2013, 8 (7), e68958
16. **Hewitt, J.E.** Abnormal glycosylation of dystroglycan in human genetic disease. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2009, 1792 (9), p. 853-861.
17. **Geis, T., Marquard, K., Rodl, T. et al.** Homozygous dystroglycan mutation associated with a novel muscle-eye-brain disease-like phenotype with multicystic leukodystrophy. *Neurogenetics*, 2013, 14 (3), p. 205-213.
18. **Wells, L.** The O-mannosylation pathway: glycosyltransferases and proteins implicated in congenital muscular dystrophy. *J Biol. Chem.*, 2013, 288 (10), p. 6930-6935.
19. **Riemersma, M., Froese, D. S., van Tol W. et al.** Human ISPD Is a Cytidyltransferase Required for Dystroglycan O-Mannosylation. *Chem. Biol.*, 2015, 22 (12), p. 1643-1652
20. **Zdražilová, L.** Dědičné poruchy glykosylace: alfa-dystroglykanopatie., *Univerzita Karlova v Praze*, 2016, Bakalářská práce.
21. **Wang, C. H., Bonnemann, C. G., Rutkowski, A. et al.** Consensus statement on standard of care for congenital muscular dystrophies. *J Child. Neurol.*, 2010, 25 (12), p. 1559-1581.
22. **Mahmood O. A., Jiang X, Zhang Q.** Limb-girdle muscular dystrophy subtypes: First-reported cohort from northeastern China. *Neural Regen. Res.*, 2013, 8 (20), p. 1907-1918.

Práce vznikla za podpory projektu AZV 16-31932A a RVO-VFN64165.

Do redakce došlo 3. 4. 2017

Adresa pro korespondenci:

RNDr. Hana Hansíková, CSc.

1. LF UK a VFN v Praze

Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch

Klinika dětského a dorostového lékařství

Ke Karlovu 2, 128 08 Praha 2

e-mail: hana.hanskova@lf1.cuni.cz