ROLA GLIKOZYLACJI W AKTYWACJI RECEPTORA NABŁONKOWEGO CZYNNIKA WZROSTU

THE ROLE OF GLYCOSYLATION IN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR ACTIVATION

Marta ZĄBCZYŃSKA, Katarzyna OPIOŁA, Ewa POCHEĆ

Zakład Biochemii Glikokoniugatów, Instytut Zoologii,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR) jest obficie N-glikozylowanym białkiem transbłonowym o właściwościach kinazy tyrozynowej. Dojrzały receptor błonowy zawiera N-glikany typu wielomannozowego i struktury kompleksowe, często rozbudowywane o anteny polilaktozoaminowe. Natomiast w formie sekrecyjnej EGFR dominują glikany typu kompleksowego. Glikany domeny zewnątrzkomórkowej regulują aktywność receptora przez wpływ na wiązanie liganda, dimeryzację i autofosforylację. Deglikozylacja EGFR powoduje zmianę konformacji przestrzennej receptora, co uniemożliwia wiązanie liganda i generowanie sygnałów wewnątrzkomórkowych. Prawidłowa glikozylacja EGFR jest również niezbędna do wewnątrzkomórkowego transportu receptora do błony komórkowej. Zmiany składu oligosacharydowego EGFR są przyczyną zaburzeń w funkcjonowaniu receptora. Zwiększenie ekspresji i/lub aktywności N-acetyloglukozaminylotransferazy V i w konsekwencji struktur kompleksowych β1,6-rozgałęzionych na EGFR prowadzi do nadmiernej aktywacji szlaków sygnałowych m.in. MAPK, Akt i JNK inicjowanych przez EGFR. Anteny polilaktozoaminowe rozbudowywane na ramieniu β1,6 glikanów EGFR, wiązane przez galektynę 3, sprzyjają utrzymaniu EGFR w błonie komórkowej i stałemu generowaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych w komórkach nowotworowych, co w konsekwencji zwiększa proliferację i migrację komórek oraz sprzyja progresji nowotworów. Efekt przeciwstawny obserwowano w przypadku zwiększenia zawartości na EGFR N-glikanów kompleksowych z N-acetyloglukozoaminą przedzielającą. Glikozylacja EGFR, jako ważny element modulujący jego aktywność, jest celem badań zmierzających do opracowania skutecznej terapii przeciwnowotworowej.

Słowa kluczowe: receptor nabłonkowego czynnika wzrostu, N-glikozylacja, nowotwory, sygnały wewnątrzkomórkowe

Summary: Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a highly N-glycosylated transmembrane protein with the enzymatic activity of tyrosine kinase. The mature EGFR contains a mixture of high-mannose N-glycans and complex-type structures extended with polylactosamine repeats. In the secreted form of EGFR, complex-type oligosaccharides dominate. Glycans attached to the EGFR extracellular domain regulate the activity of the receptor, affecting ligand binding, receptor dimerization and autophosphorylation. Deglycosylation of EGFR alters the spatial conformation of the receptor, preventing ligand binding and generating intracellular signals. N-glycosylation is also essential for intracellular transport of the receptor to the cell membrane. Changes of glycosylation disturb receptor functioning. An increase of N-acetylglucosaminyltransferase V expression and/or activity and in consequence its products, β1,6-branched structures on EGFR, leads to overactivation of the MAPK, Akt and JNK signaling pathways initiated by EGFR. Polylactosamine antennae extended on β1,6-branches of N-glycans bound by galectin 3 contribute to maintenance of EGFR in the cell membrane and continuous generation of intracellular signals in cancer cells. These finally enhance cell proliferation and migration, promoting tumor progression. The opposite effect was observed for complex N-glycans with bisected N-acetylglucosamine on EGFR. Glycosylation of EGFR, as an important factor affecting its activity, is the subject of research aimed at developing an effective anti-cancer therapy.

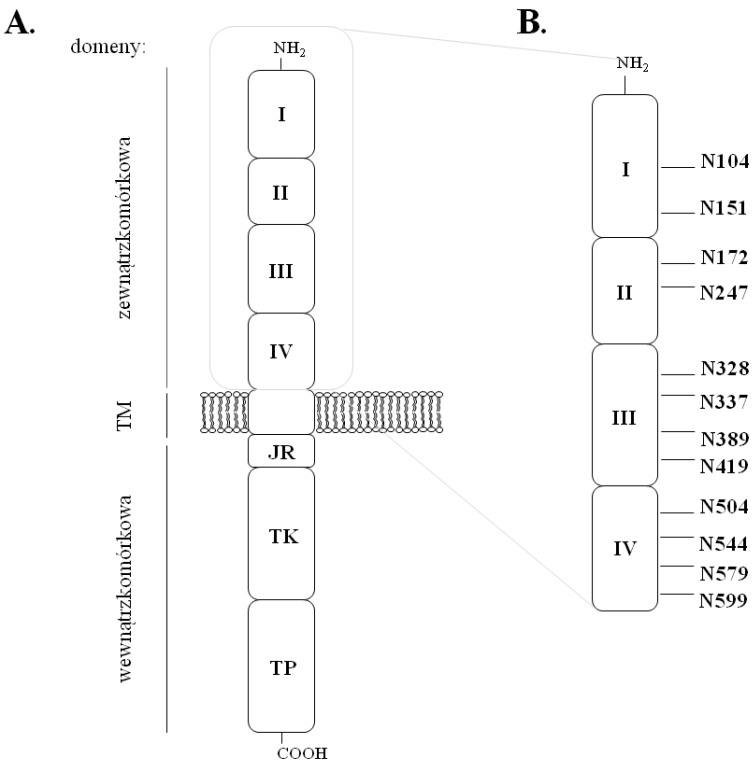
Key words: epidermal growth factor receptor, N-glycosylation, cancers, intracellular signaling

WSTĘP

Receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) odkryty w 1978 roku przez Stanley'a Cohena i wsp. [56], był pierwszym opisanym receptorem o aktywności kinazy tyrozynowej (ang. *Receptor Tyrosine Kinase*, RTK) [17]. Obecnie białka z rodziny EGFR należą do najintensywniej badanych receptorów błonowych [1, 20]. Podstawową funkcją EGFR jest regulacja proliferacji komórek [23]. EGFR odgrywa kluczową rolę w patogenezie różnych chorób, m.in. nowotworów piersi i jajnika [4, 15, 35]. Efektem zwiększonej ekspresji i aktywacji EGFR jest nadmierna proliferacja komórek, związana z rozwojem nowotworów [38]. Aktywność EGFR jest regulowana przez N-glikany (N-oligosacharydy) [21], których skład ulega zmianie w procesie nowotworzenia, co przyczynia się do wzmożonej aktywności receptora [60]. Rola glikanów w funkcjonowaniu EGFR oraz zmiany glikozylacji EGFR towarzyszące rozwojowi nowotworów opisano w dalszej części pracy.

EGFR: STRUKTURA, LIGANDY I FUNKCJE

EGFR (ErbB1, HER1) jest białkiem przezbłonowym o aktywności kinazy tyrozynowej [58]. Należy do rodziny receptorów ErbB, której nazwa wskazuje na homologię genów rodziny receptorów ErbB z onkogenem v-erb B ptasiego wirusa erytroblastozy (ang. *erythroblastoma B viral gene product,* v-erbB) [30]. Poza



RYCINA 1. Budowa receptora nabłonkowego czynnika wzrostu. **A.** EGFR zbudowany jest z części zewnątrzkomórkowej, przezbłonowej TM (ang. *Transmembrane Domain*) oraz wewnątrzkomórkowej. W obrębie części wewnątrzkomórkowej wyróżniamy region okołobłonowy (ang. *Juxtamembrane Region*, JR), domenę o aktywności kinazy tyrozynowej (ang. *Tyrosine Kinase domain,* TK) i domenę C-końcową z miejscami autofosforylacji (ang. *Tyrosine Phosphorylation domain,* TP). **B.** W skład części zewnątrzkomórkowej wchodzą cztery funkcjonalne domeny I-IV, w obrębie których obecnych jest 12 miejsc N-glikozylacji. N, asparagina

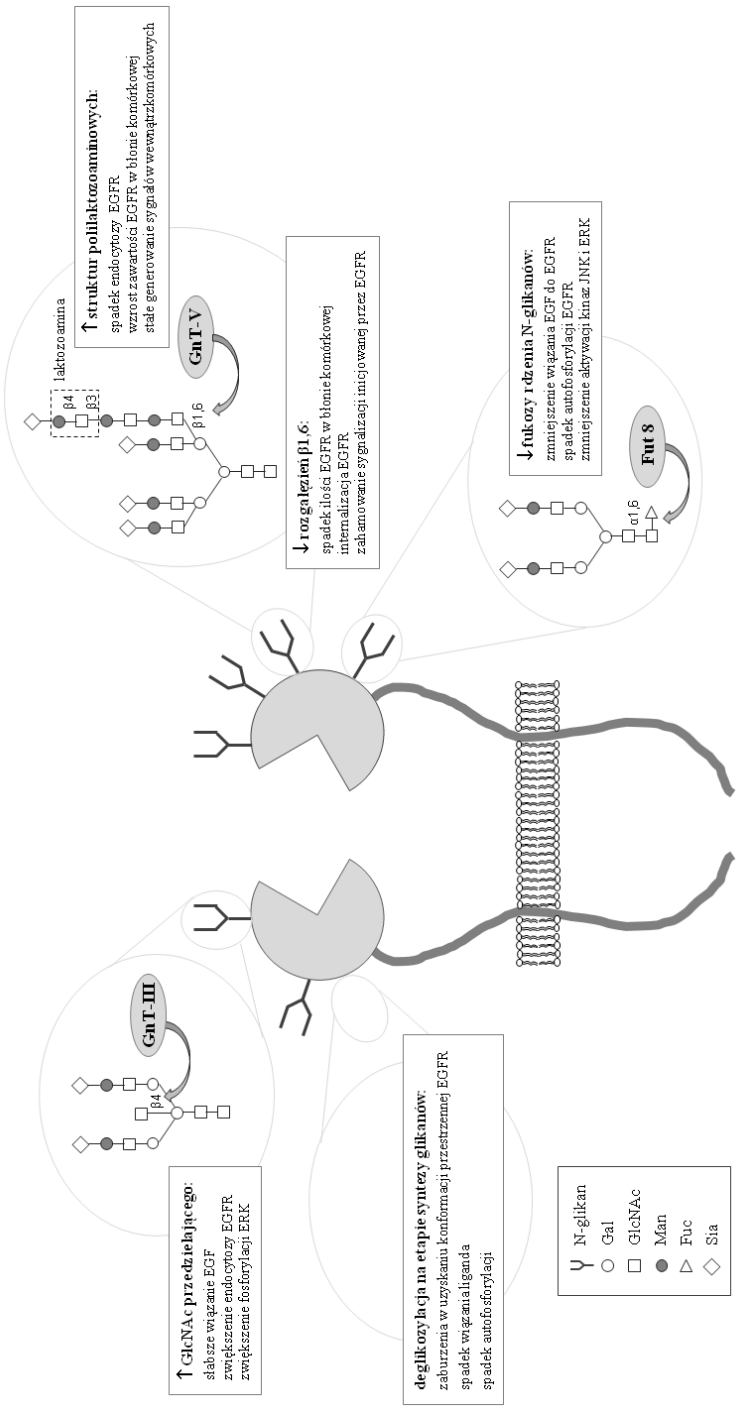
FIGURE 1. The structure of epidermal growth factor receptor. **A.** EGFR is composed of three regions: extracellular, transmembrane and intercellular. The intracellular part is divided into the juxtamembrane region (JR), tyrosine kinase domain (TK) and C-terminal tail with five tyrosine phosphorylation domain (TP) autophosphorylation sites. **B.** The extracellular region of EGFR contains four functional domains (I-IV) with 12 potential N-glycosylation sites. N, asparagine

EGFR rodzina ErbB obejmuje jeszcze trzy inne receptory: ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3), ErbB4 (HER4) [3, 17], które są podobnie zbudowane a różnią się aktywującymi je ligandami oraz właściwościami katalitycznymi [2, 23]. U ludzi białko EGFR zbudowane jest z 1186 aminokwasów tworzących fragment zewnątrzkomórkowy, przezbłonowy i wewnątrzkomórkowy. N-końcowa, zewnątrzkomórkowa część EGFR składa się z czterech subdomen I–IV, z których II i IV zawierają

sekwencje bogate w cysteinę, uczestniczące w tworzeniu mostków disiarczkowych a domena III odpowiedzialna jest za wiązanie liganda. Położona terminalnie domena I uczestniczy w dimeryzaji receptorów zależnej od związania liganda [10, 48, 52]. Część transbłonową stanowi pojedyncza α-helikalna struktura. Część wewnątrzkomórkową budują trzy domeny; okołobłonowa, domena o aktywności kinazy tyrozynowej oraz domena C-końcowa z pięcioma miejscami autofosforylacji, pełniąca również funkcję autoinhibitora (ryc. 1). Gen kodujący EGFR, zlokalizowany na chromosomie 7, ulega ekspresji we wszystkich komórkach nabłonkowych, komórkach tkanki łącznej, niektórych komórkach glejowych i mięśniach gładkich [55] oraz w komórkach nowotworowych o różnym pochodzeniu [32, 38, 56]. W guzach nowotworowych białka z rodziny EGFR ulegają nadekspresji lub mutacji, co prowadzi do wzmożonej aktywacji szlaków sygnałowych i nadmiernej proliferacji tych komórek [11]. Rozwojowi nowotworów sprzyja również zmieniona glikozylacja receptora, która w istotny sposób modyfikuje sygnały generowane przez związanie liganda do EGFR [41, 52]. Najważniejsze zmiany glikozylacji EGFR obserwowane w komórkach nowotworowych zebrano na rycinie 2.

Receptory ErbB są aktywowane po związaniu się z czynnikami wzrostu z rodziny EGF. Wyróżniamy trzy grupy ligandów dla receptorów ErbB. Do pierwszej zaliczamy naskórkowy czynnik wzrostu (ang. *Epidermal Growth Factor,* EGF), transformujący czynnik wzrostu α (ang. *Transforming Growth Factor α*, TGFα,) i amfiregulinę (ang. *Amphiregulin,* AR), które wiążą się specyficznie do EGFR. Drugą grupę ligandów stanowią betacellulina (ang. *Betacellulin,* BTC), naskórkowy czynnik wzrostu wiążący heparynę (ang. *Heparin-Binding Epidermal Growth Factor,* HB-EGF) i epiregulina (ang. *Epiregulin*, EPR), wiążące się do EGFR i ErbB4. Do trzeciej grupy ligandów EGFR zaliczamy neureguliny (ang. *Neuregulin*, NRG), przy czym NRG-1 i NRG-2 wiążą się do ErbB3 i 4, a NRG-3 i NRG-4 wyłącznie do ErbB4 [32].

Wiązanie liganda do EGFR aktywuje receptor powodując zmiany konformacyjne polegające na rearanżacji w układzie subdomen części zewnątrzkomórkowej receptora prowadzące do połączenia subdomeny I i III, co skutkuje homo- lub heterodimeryzacją receptora. Dimeryzacja receptora EGF z kolei umożliwia interakcje domen wewnątrzkomórkowych receptorów w danej parze i wzajemną fosforylację pięciu tyrozyn (Tyr1173, Tyr1148, Tyr1086, Tyr1068 i Tyr922) w C-końcowej części receptora. Wiązanie białek sygnałowych zawierających domeny SH2 (ang. *Src-Homology 2*) i PTB (ang. *Phosphotyrosine Binding*) do fosforylowanych tyrozyn aktywnego dimeru EGFR uruchamia wewnątrzkomórkowe kaskady sygnałowe, m.in. szlak kinaz aktywowanych mitogenami (ang. *Mitogen Activated Protein Kinases,* MAPK) i kinaz fosfatydyloinozytolu (ang. *Phosphatidylinositol 3-Kinase,* PI3K) [7, 23, 33, 51]. EGFR inicjując sygnały wewnątrzkomórkowe pobudza ekspresję genów, w tym czynników transkrypcyjnych, które regulują ekspresję innych genów. Produkty genów czynników transkrypcyjnych



RYCINA 2. Rola N-glikanów w funkcjonowaniu EGFR. Fuc, fukoza; Fut 8, α1,6-fukozylotransferaza; Gal, galaktoza; GlcNAc, N-acetylo-glukozoamina; GnT-III, β1,6-N-acetyloglukozaminylotransferaza V; GnT-V, N-acetyloglukozaminylotransferaza V; Man, mannoza; Sia, kwas sjalowy

FIGURE 2. Role of N-glycans in EGFR functioning. Fuc, fucose; Fut 8, α1,6-fucosyltransferase; Gal, galactose; GlcNAc, N-acetylglucosamine; GnT-III, β1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III; GnT-V, β1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V; Man, mannose; Sia, sialic acid

aktywują geny odpowiedzialne za procesy proliferacji, różnicowania, migracji i apoptozy komórek. Tym samym pobudzenie EGFR uruchamia w komórce złożoną sieć ścieżek sygnałowych mających początek w receptorach błonowych a kończących się w jądrze komórkowym [32, 33].

Sygnały generowane przez EGFR są kontrolowane przez integryny, czyli przezbłonowe heterodimeryczne glikoproteiny należące do grupy białek adhezyjnych (ang. *Cell Adhesion Molecule,* CAM) odpowiedzialne za adhezję i migrację komórek [6]. Zależna od integryn adhezja komórek do składników macierzy pozakomórkowej (ang. *Extracellular Matrix,* ECM) może powodować transaktywację różnych białek z rodziny RTK pod nieobecność ligandów dla czynników wzrostu. Jedne z pierwszych badań, które potwierdziły współdziałanie integryn i receptorów czynników wzrostu w aktywowaniu szlaków wewnątrzkomórkowych, dotyczyły EGFR. Pobudzenie szlaków sygnałowych przez EGFR jest konieczne do aktywacji białka sygnałowego Rac, należącego do rodziny GTP-az Rho, i PI3K, ponieważ komórki z nieaktywnym receptorem EGF nie tworzą lamellipodów przy krawędzi wiodącej i w konsekwencji nie przemieszczają się po fibronektynie (ang. *Fibronectin,* FN). W przypadku nieaktywnego EGFR, mimo zależnego od integryn kontaktu komórek z FN, sygnały wewnątrzkomórkowe nie są generowane i ruch komórki nie jest możliwy [29].

GLIKOZYLACJA EGFR

Glikozylacja jest jedną z najczęstszych modyfikacji potranslacyjnych białek. Większość białek błonowych i wydzielniczych zawiera kowalencyjnie związane glikany. Ze względu na typ wiązania między białkiem a oligosacharydem wyróżniamy N- i O-glikany. N-glikany przyłączone są wiązaniem glikozydowym do asparaginy (Asn) będącej częścią sekwencji Asn-X-Ser/Thr białka (X to dowolny aminokwas z wyjątkiem proliny), natomiast O-glikany przyłączone są wiązaniem glikozydowym do seryny (Ser) lub treoniny (Thr) białka. W obrębie N-glikanów wyróżniamy struktury wielomannozowe, hybrydowe i kompleksowe różniące się rodzajem monosacharydów wchodzących w ich skład. Do mannozy (Man) wspólnego dla wszystkich N-glikanów rdzenia, utworzonego z pentasacharydu (GlcNAc-GlcNAc-Man(Man)-Man), w oligosacharydach wielomannozowych dołączone są wyłącznie reszty Man. W oligosacharydach kompleksowych część zewnętrzna zbudowana jest z galaktozy (Gal), N-acetyloglukozoaminy (GlcNAc), kwasu sjalowego (Sia) i fukozy (Fuc). Pośredni typ hybrydowy zawiera elementy budowy typu wielomannozowego i kompleksowego. Glikozylacja jest procesem enzymatycznym, dlatego czynnikiem determinującym w największym stopniu strukturę glikanu jest aktywność glikozylotransferaz, zdolnych do przyłączenia monocukru oraz glikozydaz hydrolizujących wiązania glikozydowe. Nie wszystkie potencjal-

ne miejsca glikozylacji są modyfikowane potranslacyjnie. Szacuje się, że N-glikany dołączane są średnio do 70% miejsc N-glikozylacji [46, 59].

W porównaniu z receptorami, które biorą udział w organogenezie, receptory o aktywności kinaz, które stymulują proliferację, wzrost i nowotworzenie, mają w sekwencji polipeptydowej pięciokrotnie więcej potencjalnych miejsc glikozylacji, dłuższe domeny zewnątrzkomórkowe i w konsekwencji więcej N-glikanów przypadających na każde 100 aminokwasów łańcucha białkowego [26, 35]. Do obficie N-glikozylowanych receptorów należy EGFR, który nie posiada miejsc wiązania O-glikanów [9, 61]. W domenie zewnątrzkomórkowej EGFR obecnych jest 12 potencjalnych miejsc N-glikozylacji (ryc. 1) [12]. Forma rozpuszczalna EGFR (ang. *secreted form of EGFR,* sEGFR), powstała w wyniku alternatywnego splicingu RNA i proteolizy z udziałem metaloproteinaz, zbudowana jest z domeny zewnątrzkomórkowej i 17 aminokwasów C-końca białka, ma masę cząsteczkową 105 kDa i zawiera 7 miejsc N-glikozylacji [61]. Każde z potencjalnych miejsc glikozylacji receptora EGF może przyłączać różny pod względem budowy oligosacharyd [48]. Stwierdzono, że wzór glikozylacji EGFR jest komórkowo i tkankowo specyficzny. Masa cząsteczkowa glikoproteiny EGFR wynosi 170 kDa [10], z czego aż do 50 kDa przypada na N-oligosacharydy [20], co stanowi 29% masy całej cząsteczki. N-glikany jako istotny element cząsteczki EGFR, regulują aktywność receptora na różnych etapach jego funkcjonowania [12].

Wiele dotychczasowych badań glikozylacji EGFR przeprowadzono wykorzystując komórki raka płaskonabłonkowego linii A431 o dwudziestokrotnie większej ekspresji EGFR w porównaniu z komórkami innych linii. Pierwsze analizy glikozylacji EGFR wykazały, że dojrzała cząsteczka receptora zawiera dwukrotnie więcej N-oligosacharydów typu kompleksowego niż wielomannozowego. Natomiast w niedojrzałej cząsteczce EGFR o mniejszej masie cząsteczkowej (160 kDa) obecne były wyłącznie ewolucyjnie starsze struktury wielomannozowe. Większość glikanów kompleksowych dojrzałej cząsteczki EGFR w komórkach linii A431 ma budowę trzy- i czteroantenową. Część struktur cukrowych dojrzałej cząsteczki receptora zawiera jedną lub dwie reszty kwasu sjalowego [5]. Szczegółową analizę budowy N-glikanów w poszczególnych miejscach glikozylacji formy błonowej i rozpuszczalnej EGFR linii A431 przeprowadził zespół Zhen i wsp. [61] stosując spektrometrię masową. Stwierdzono, że większość oligosacharydów sEGFR ma budowę typu kompleksowego, natomiast glikany receptora błonowego stanowiły mieszaninę oligosacharydów wielomannozowych i kompleksowych. W pięciu miejscach glikozylacji łańcucha białkowego sEGFR (Asn32, Asn389, Asn420, Asn504, Asn544) wykazano obecność struktur kompleksowych, pozostałe dwie asparaginy (Asn337 i Asn599) wiązały oligosacharydy wielomannozowe. Struktura glikanów receptora błonowego była bardziej zróżnicowana niż formy wydzielniczej EGFR. Zidentyfikowano ponad 30 glikoform w klasycznej formie błonowej EGFR i tylko 20 w sEGFR. Miejsce Asn504 w formie błonowej

receptora było zajmowane zamiennie przez struktury wielomannozowe i kompleksowe. Nie do wszystkich potencjalnych miejsc N-glikozylacji w cząsteczce EGFR przyłączone są oligosacharydy. Zarówno w EGFR jak i w sEGFR, asparaginy w pozycji Asn104 i Asn172 były wolne od glikanów, natomiast Asn32 i Asn579 były częściowo glikozylowane [61]. Stosując metodę ukierunkowanej mutagenezy miejsc glikozylacji wykazano, że oligosacharydy dołączone do Asn420 EGFR są istotne do wiązania receptora z EGF oraz zabezpieczają EGFR przed spontaniczną oligomeryzacją w błonie komórkowej, która prowadzi do niekontrolowanej aktywacji EGFR [52].

WPŁYW GLIKOZYLACJI EGFR NA PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU

Wpływ glikozylacji na funkcje EGFR był intensywnie badany od lat 80. ubiegłego wieku, kiedy po raz pierwszy podjęto próbę oceny roli komponenty cukrowej EGFR w funkcjonowaniu całej cząsteczki [42, 43]. Całkowite zahamowanie procesu glikozylacji EGFR poprzez podanie tunikamycyny do hodowli komórek linii A431, znacząco obniżało wiązanie liganda przez EGFR oraz zmniejszało poziom fosforylacji EGFR. Zatrzymanie procesu glikozylacji na etapie struktur wielomannozowych przez zastosowanie swainsoniny, roślinnego alkaloidu hamującego syntezę struktur kompleksowych, nie powodowało zmian w powinowactwie do liganda [43]. Wykorzystanie inhibitorów glikozylacji wykazało, że glikozylacja EGFR jest niezbędna do wiązania EGF [43] a kolejne badania pozwoliły na stwierdzenie, że N-glikany receptora są istotne również w transporcie EGFR do błony komórkowej [42].

Jednym z najbardziej istotnych enzymów szlaku biosyntezy N-glikanów regulujących sygnalizację EGFR jest β1,6-N-acetyloglukozaminylotransferaza V (ang. *β1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V,* GnT-V), kodowana u ludzi przez gen *MGAT5*. GnT-V jest transferazą odpowiedzialną za połączenie GlcNAc wiązaniem β1,6-glikozydowym z Man rdzenia N-glikanów i tworzenie wieloantenowych glikanów typu kompleksowego, które są rozbudowywane do struktur polilaktozoaminowych (powtórzenia disacharydów Galβ1,4GlcNAcβ1,3) [13]. Zwiększona ekspresja i/lub aktywność GnT-V i w konsekwencji zawartość struktur kompleksowych β1,6-rozgałęzionych, związana jest z inwazyjnym charakterem nowotworu i zdolnością do tworzenia przerzutów [34, 50]. Większość glikanów EGFR jest modyfikowana przez GnT-V i rozbudowywana o struktury polilaktozoaminowe [45, 60]. Struktury polilaktozoaminowe wiązane są przez lektyny endogenne, z których najlepiej poznana jest galektyna-3 (Gal-3). Połączenie glikozylowanego EGFR i Gal-3 tworzy na powierzchni komórki molekularną sieć białkowo-cukrową zapobiegającą endocytozie receptora i tym samym

warunkuje utrzymanie receptora w błonie komórkowej w formie aktywnej, stale generującej sygnały wewnątrzkomórkowe [31, 36]. Struktury oligosacharydowe EGFR sięgają na odległość 10 Å od części białkowej, natomiast wiązanie za pośrednictwem Gal-3 odsuwa EGFR o 100 Å od białka stanowiąc fizyczną barierę zabezpieczającą przed dimeryzacją receptorów niezależną od liganda [8]. W komórkach nabłonkowych raka sutka wyizolowanych z transgenicznych myszy *Mgat5*$^{-/-}$, u których nowotwór indukowano onkogenem PyMT (ang. *Polyomavirus Middle T oncogene*) stwierdzono znaczącą redukcję oddziaływania Gal-3 z EGFR. Podobne osłabienie wiązania Gal-3 do EGFR obserwowano po wcześniejszej inkubacji Gal-3 z laktozą, stanowiącą inhibitor kompetycyjny dla wiązania cukrowych ligandów przez lektynę. Konsekwencją zablokowania oddziaływań Gal-3 z EGFR było zahamowanie ścieżek sygnałowych aktywowanych przez EGFR [34]. Spotęgowanie aktywacji szlaku sygnałowego EGFR na powierzchni komórki przez połączenie struktur polilaktozoaminowych EGFR i Gal-3 jest jednym z trzech mechanizmów nabycia zdolności do tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe, w którym bierze udział GnT-V [31].

Glikozylacja EGFR regulująca sygnały inicjowane przez receptor, wpływa na migrację i inwazję komórek nowotworowych [27]. Ludzkie komórki raka piersi linii MDA-MB-231 o wysokim potencjale inwazyjnym i metastatycznym, po wyciszeniu ekspresji genu *MGAT5* z użyciem małych interferujących cząsteczek RNA (ang. *small interfering RNA,* siRNA) wiązały się mocniej do podłoża oraz wolniej migrowały w sposób zależny od EGFR. Zmniejszenie liczby rozgałęzień glikanów obecnych na EGFR, w efekcie wyciszenia genu *MGAT5*, w sposób istotny hamowało szlaki sygnalizacyjne uruchamiane przez EGFR, osłabiając inwazyjny fenotyp komórek nowotworowych. Zmniejszenie liczby anten N-glikanów obecnych na EGFR powodowało znaczące zahamowanie zależnej od EGFR aktywacji białkowej fosfatazy tyrozynowej (ang. *Src Homology region 2-containing protein tyrosine Phosphatase-2,* SHP-2) i defosforylacji kinazy ognisk przylegania (ang. *Focal Adhesion Kinase,* FAK) a w konsekwencji redukcję polimeryzacji aktyny oraz przemieszczania się komórek w teście gojenia ran i migracji z użyciem komór Boydena [14].

W warunkach prawidłowych sygnały generowane przez EGFR są kluczowe m.in. do utrzymania homeostazy komórek skóry. Oprócz EGF również inne ligandy wiązane przez EGFR w komórkach naskórka, takie jak HB-EGF, TGFα oraz AR, są odpowiedzialne za utrzymanie równowagi proliferacyjnej w komórkach naskórka [40]. Kimura i wsp. [22] wykazali że brak glikanów o rozgałęzieniach β1,6 u myszy *Mgat5*$^{-/-}$ (z nokautem genu *Mgat5)* obniżał ekspresję EGFR i Gal-3 w błonie komórkowej keratynocytów. Zawartość EGFR w lizacie komórkowym pozostawała bez zmian, co pokazało, że obecność β1,6-rozgałęzionych glikanów na EGFR jest niezbędna do zakotwiczenia EGFR w błonie komórkowej. Obniżeniu poziomu EGFR w błonie komórkowej towarzyszył spadek proliferacji keratynocytów,

wynikający z braku sygnałów generowanych przez EGFR. Co ciekawe, aktywność EGFR zależy od obecności glikanów β1,6-rozgałęzionych na EGFR. Wiązanie jednego z ligandów, HB-EGF, do EGFR zwiększa ekspresję enzymu odpowiedzialnego za syntezę glikanów β1,6-rozgałęzionych, tym samym zapewniając obecność struktur β1,6-rozgałęzionych na EGFR [22]. Sygnalizacja z udziałem EGFR regulowana jest również przez kaweolinę-1 w sposób zależny od glikozylacji EGFR [25]. Kaweolina-1 (ang. *Caveolin-1*, Cav-1), główny składnik mikrodomen błony komórkowej zwanych kaweolami, oddziałuje z błonowymi receptorami czynników wzrostu, osłabiając przekazywanie sygnału prowadzącego do proliferacji oraz migracji komórek i w efekcie hamuje rozwój nowotworów [24]. U myszy *Mgat5*$^{-/-}$, które nie syntetyzują struktur β1,6-rozgałęzionych, tworzenie molekularnej sieci na powierzchni komórek z udziałem EGFR jest znacząco zredukowane. Upośledzenie tworzenia sieci molekularnej na powierzchni komórek pozwala na oddziaływanie EGFR z Cav-1 obecną w mikrodomenach błonowych, internalizację receptora i w efekcie prowadzi do zahamowania sygnalizacji inicjowanej przez EGFR [25].

Kolejnym enzymem szlaku N-glikozylacji, ważnym dla aktywności EGFR, jest β1,4-N-acetyloglukozaminylotransferaza III (ang. *β1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III*, GnT-III) odpowiedzialna za tworzenie tak zwanych struktur przedzielonych [44]. GnT-III katalizuje dołączenie reszty GlcNAc wiązaniem β1,4 do rdzeniowej Man struktur kompleksowych i hybrydowych N-glikanów [60]. Powstanie struktury przedzielonej hamuje dalszą rozbudowę cząsteczki oligosacharydu, m.in. o rozgałęzienia β1,6. Brak rozgałęzień β1,6 w istotny sposób wpływa na zachowanie komórek [16], powodując zmniejszenie właściwości adhezyjnych i migracyjnych komórek oraz zdolności do przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych [44, 47]. Wykazano, że przedzielone struktury kompleksowe utrudniają wiązanie EGF do EGFR. Stwierdzono, że obecność N-glikanu z GlcNAc przedzielającą w miejscu wiązania liganda może determinować powinowactwo EGFR do liganda. EGFR w komórkach glejaka ludzkiej linii U-373 MG z nadekspresją GnT-III wiązał słabiej EGF niż EGFR w komórkach kontrolnych [37]. Do badań nad udziałem GnT-III w aktywności EGFR wykorzystano również komórki linii HeLaS3 transfekowane genem kodującym GnT-III. Stwierdzono, że zwiększona liczba struktur GlcNAc przedzielonych na EGFR w komórkach transfekowanych, zwiększa poziom fosforylacji kinazy regulowanej sygnałami zewnątrzkomórkowymi (ang. *Extracellular signal-Regulated Kinase* ERK) po aktywacji EGFR przez EGF podany do hodowli [39]. Nadekspresja GnT-III prowadzi również do zwiększenia endocytozy EGFR, co ma związek z oddziaływaniem receptora z Gal-3 [47] opisanym powyżej. Aktywność GnT-III i genu kodującego GnT-III (*Mgat3/MGAT3*) kojarzona jest z osłabieniem proliferacji i migracji komórek nowotworowych [16, 60]. Rozwój nowotworu u myszy pozbawionych genu *Mgat3* i w konsekwencji glikanów z GlcNAc przedzielającą, m.in. na EGRF, przebiega szybciej, komórki nowotworowe mają większy potencjał migracyjny, co w krótszym czasie prowadzi

do tworzenia przerzutów do płuc. Nadekspresja genu *Mgat3* w komórkach jajnika chomika chińskiego (ang *Chinese Hamster Ovary*, CHO), w których proces nowotworzenia indukowano onkogenem PyMT, redukuje proliferację komórek i transmisję sygnałów wewnątrzkomórkowych generowanych przez EGFR, zależną od molekularnej sieci białkowo-cukrowej tworzonej przez galektyny [44].

O dostępności do miejsca wiązania EGF decyduje konformacja przestrzenna receptora EGFR, uwarunkowana obecnością N-glikanów w domenie zewnątrzkomórkowej. Zastosowanie tunikamycyny, hamującej całkowicie proces glikozylacji białek na etapie przeniesienia prekursorowego oligosacharydu na Asn białka, powoduje, że przeciwciała monoklonalne mAb 425, rozpoznające epitop białkowy w domenie zewnątrzkomórkowej EGFR, nie wiążą się do EGFR. Brak wiązania mAb 425 po zastosowaniu tunikamycyny obserwowano również w przypadku skróconej formy EGFR o 267-aminokwasowy fragment w domenie zewnątrzkomórkowej (EGFRvIII), który zawiera 4 potencjalne miejsca glikozylacji. Glikozylacja EGFR jest niezbędna do utrzymania konformacji przestrzennej białka EGFR koniecznej do interakcji EGFR-przeciwciało [10]. Kluczowe znaczenie N-glikozylacji w utrzymaniu aktywnej konformacji przestrzennej EGFR potwierdziły ostatnie badania Kaszuba i wsp. [20]. N-glikany są niezbędne do autofosforylacji EGFR [10]. Forma EGFRvIII, obecna w komórkach ludzkiego glejaka wielopostaciowego, będąca produktem zmutowanego genu, nie wiąże liganda, jednak podlega dimeryzacji, oraz ma konstytutywną aktywność kinazy, co sprzyja procesowi nowotworzenia [10, 57]. Zmiany konformacyjne wywołane deglikozylacją powodują spadek aktywności kinazy tyrozynowej EGFR zarówno w formie prawidłowej jak i zmutowanej [10]. Aglikozylacja receptora w wyniku zastosowania tunikamycyny powoduje utratę zdolności receptora do wiązania liganda oraz autofosforylacji. Natomiast enzymatyczne usunięcie glikanów z dojrzałej cząsteczki receptora, obecnej na powierzchni komórki, nie zmienia funkcjonowania EGFR, co dowodzi, że obecność glikanów jest niezbędna w momencie obróbki i fałdowania białka EGFR do stworzenia odpowiedniej konformacji domeny wiążącej EGF [2].

Sygnalizacja EGFR regulowana jest również przez fukozylację rdzenia N-glikanów będącą efektem działania α1,6-fukozylotransferazy (ang. *α1,6-Fucosyltransferase,* Fut 8). Fut 8 katalizuje dołączenie fukozy do reszty GlcNAc rdzenia N-glikanów hybrydowych i kompleksowych wiązaniem α1,6-glikozydowym [53, 54]. Poziom fosforylacji EGFR zależny od wiązania EGF w fibroblastach myszy z nokautem genu *Fut 8* (*Fut8*$^{-/-}$), kodującego α1,6-fukozylotransferazę, był znacząco niższy niż u muszy typu dzikiego (*Fut8*$^{+/+}$). Aktywacja JNK (ang. *c-Jun N-terminal/stress activated protein Kinase*) i ERK, kinaz białkowych szlaków sygnałowych aktywowanych przez EGFR, była zahamowana w komórkach z nieaktywnym genem *Fut8*. Brak zmian w aktywności fosfataz tyrozynowych w komórkach myszy *Fut8*$^{-/-}$ wskazywał, że zmieniona aktywność EGFR i wspomnianych białek z rodziny MAP zależnych od EGFR jest efektem braku Fuc przyłączonej do rdzenia N-glikanów.

Defukozylacja oligosacharydów EGFR jest przyczyną słabszego wiązania EGF do EGFR w komórkach *Fut8*$^{-/-}$ w porównaniu do fibroblastów typu dzikiego [54]. W ludzkich komórkach nowotworu płuc linii CL1-5 wyciszenie genu *FUT 8* hamuje dimeryzację i autofosforylację EGFR [28]. Kolejne badania wykazały, że fukozylacja rdzenia N-glikanów EGFR jest niezbędna w regeneracji wątroby. Brak Fut8 u myszy *Fut8*$^{-/-}$ hamował proliferację hepatocytów zależną od aktywności EGFR. Poziom fosforylacji EGFR w wątrobie myszy z nokautem genu *Fut8* był znacząco niższy niż hepatocytach myszy typu dzikiego. Odpowiedź hepatocytów myszy *Fut8*$^{-/-}$ na egzogenny EGF w hodowli *in vitro* była słabsza w porównaniu do hepatocytów kontrolnych, co potwierdza, że wiązanie EGF przez EGFR jest ułatwiane przez α1,6-fukozylację EGFR [53].

Obecność glikanów, warunkujących właściwą konformację całej cząsteczki EGFR, jest także istotna podczas transportu receptorów EGFR do błony komórkowej. ErbB3 jest nietypowym przedstawicielem rodziny EGFR, ponieważ nie posiada funkcjonalnej domeny o aktywności kinazy tyrozynowej, a jest jedynie partnerem do dimeryzacji dla innych receptorów z rodziny EGFR. ErbB3 posiada 10 miejsc N-glikozylacji. Oceniano wpływ mutacji punktowych pojedynczych miejsc N-glikozylacji na obecność receptorów ErbB3 w błonie komórkowej. Usunięcie pięciu miejsc glikozylacji zlokalizowanych w domenie III znacząco zmniejsza ekspresję ErbB3. Stwierdzono, że obecność glikanów na cząsteczce ErbB3 jest niezbędna do prawidłowego transportu tego receptora do błony komórkowej, tak jak w przypadku wielu innych białek [49]. Łańcuchy cukrowe domeny III ErbB3, istotnej w wiązaniu liganda, wpływają również na funkcję ErbB3. Oligosacharyd związany z Asn420 ma kluczowe znaczenie dla aktywacji EGFR, ponieważ zapobiega niekontrolowanej aktywności receptora. Punktowa mutacja w miejscu Asn420 prowadzi do spontanicznej oligomeryzacji i niekontrolowanej aktywacji receptora [52].

Sygnalizacja EGFR zależy nie tylko od glikozylacji samego receptora, ale również od glikozylacji integryn współdziałających z EGFR. Tworzenie kompleksu obydwu mocno glikozylowanych integryn z EGFR, zachodzi za pośrednictwem opisanej wyżej Gal-3. Laktoza, kompetycyjny inhibitor galaktozy wiązanej przez Gal-3, częściowo blokuje tworzenie kompleksów integryny α6β4 z EGFR, co wskazuje, że integryny wiążą się z EGFR za pośrednictwem oligosacharydów [19]. Częściowa deglikozylacja integryn powoduje zmianę składu N-glikanów EGFR. W keratynocytach z ekspresją podjednostki integrynowej β4 pozbawionej 5 miejsc N-glikozylacji (Asn327, Asn491, Asn579, Asn617, Asn695), zawartość N-glikanów z rozgałęzieniami β1,6GlcNAc na EGFR, jest mniejsza w porównaniu do keratynocytów z w pełni glikozylowaną podjednostką β4. Na EGFR w miejsce struktur β1,-6-rozgałęzionych, wiązanych przez integrynę β4 za pośrednictwem Gal-3, pojawiają się N-glikany z GlcNAc przedzielającą. W ten sposób przebudowa N-glikanów EGFR, wymuszona przez zmiany glikozylacji integryny, obniża wiązanie receptora EGF z Gal-3 i w konsekwencji kompleksów EGFR–β4 [18].

PODSUMOWANIE

Wyniki licznych badań wskazują, że N-glikozylacja EGFR reguluje funkcjonowanie EGFR poprzez wpływ na proces aktywacji, wiązania liganda oraz dimeryzację receptora (ryc. 2), a zmiany w składzie oraz stopniu rozbudowania struktur oligosacharydowych EGFR, obok zwiększonej ekspresji EGFR lub mutacji genu kodującego EGFR, sprzyjają onkogenezie. Pełne zrozumienie znaczenia części cukrowej EGFR w aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych jest bardzo ważne, ponieważ EGFR jest celem, z którym wiąże się duże nadzieje w leczeniu chorób nowotworowych [20]. Uwzględnienie roli N-glikanów w odpowiedzi EGFR na leki blokujące aktywność EGFR może przyczynić się do opracowania skuteczniejszych terapii przeciwnowotworowych niż stosowane dotychczas.

LITERATURA

[1] Atalay G, Cardoso F, Awada A, Piccart MJ. Novel therapeutic strategies targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) family and its downstream effectors in breast cancer. *Ann Oncol* 2003; **14**: 1346-1363.

[2] Bishayee S. Role of conformational alteration in the epidermal growth factor receptor (EGFR) function. *Biochem Pharmacol* 2000; **60:** 1217-1223.

[3] Bogdan S, Klambt C. Epidermal growth factor receptor signaling. *Curr Biol* 2001; **11**: R292-295.

[4] Che MI, Huang J, Hung JS, Lin YC, Huang MJ, Lai HS, Hsu WM, Liang JT, Huang MC. β1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase III modulates cancer stemness through EGFR signaling pathway in colon cancer cells. *Oncotarget* 2014; **5**: 3673-3684.

[5] Cummings RD, Soderquist AM, Carpenter G. The oligosaccharide moieties of the epidermal growth factor receptor in A-431 cells. Presence of complex-type N-linked chains that contain terminal N-acetylgalactosamine residues. *J Biol Chem* 1985; **260**: 11944-11952.

[6] Danen EHJ. Integrin signaling as a cancer drug target. *ISRN Cell Biology* 2013; **2013**: 135164.

[7] Dawson JP, Berger MB, Lin CC, Schlessinger J, Lemmon MA, Ferguson KM. Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 7734-7742.

[8] Dennis JW, Lau KS, Demetriou M, Nabi IR. Adaptive regulation at the cell surface by N-glycosylation. *Traffic* 2009; **10**: 1569-1578.

[9] Drake PM, Cho W, Li B, Prakobphol A, Johansen E, Anderson NL, Regnier FE, Gibson BW, Fisher SJ. Sweetening the pot: adding glycosylation to the biomarker discovery equation. *Clin Chem* 2010; **56**: 223-236.

[10] Fernandes H, Cohen S, Bishayee S. Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association: a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII/DeltaEGFR) expressed in cancer cells. *J Biol Chem* 2001; **276**: 5375-5383.

[11] Fuster MM, Esko JD. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**: 526-542.

[12] Gabius HJ, van de Wouwer M, André S, Villalobo A. Down-regulation of the epidermal growth factor receptor by altering N-glycosylation: emerging role of β1,4-galactosyltransferases. *Anticancer Res* 2012; **32**: 1565-1572.

[13] Gu J, Isaji T, Xu Q, Kariya Y, Gu W, Fukuda T, Du Y. Potential roles of N-glycosylation in cell adhesion. *Glycoconj J* 2012; **29**: 599-607.

[14] Guo HB, Randolph M, Pierce M. Inhibition of a specific N-glycosylation activity results in attenuation of breast carcinoma cell invasiveness-related phenotypes: inhibition of epidermal growth factor-induced dephosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 2007; **282**: 22150-22162.
[15] Hynes NE, Horsch K, Olayioye MA, Badache A. The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocr Relat Cancer* 2001; **8**: 151-159.
[16] Isaji T, Kariya Y, Xu Q, Fukuda T, Taniguchi N, Gu J. Functional roles of the bisecting GlcNAc in integrin-mediated cell adhesion. *Methods Enzymol* 2010; **480**: 445-459.
[17] Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in cancers: overexpression and therapeutic implications. *Mol Biol Int* 2014; **2014**: 852748.
[18] Kariya Y, Gu J. N-glycosylation of ß4 integrin controls the adhesion and motility of keratinocytes. *PLoS One* 2011; **6**: e27084.
[19] Kariya Y, Kawamura C, Tabei T, Gu J. Bisecting GlcNAc residues on laminin-332 down-regulate galectin-3-dependent keratinocyte motility. *J Biol Chem* 2010; **285**: 3330-3340.
[20] Kaszuba K, Grzybek M, Orłowski A, Danne R, Róg T, Simons K, Coskun Ü, Vattulainen I. N-Glycosylation as determinant of epidermal growth factor receptor conformation in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; **112:** 4334-4339.
[21] Kawashima N, Yoon Sj, Itoh K, Nakayama K. Tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor is regulated by GM3 binding through carbohydrate to carbohydrate interactions. *J Biol Chem* 2009; **284**: 6147-6155.
[22] Kimura A, Terao M, Kato A, Hanafusa T, Murota H, Katayama I, Miyoshi E. Upregulation of N-acetylglucosaminyltransferase-V by heparin-binding EGF-like growth factor induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia. *Exp Dermatol* 2012; **21**: 515-519.
[23] Klein A, Sińczak A, Jurek A. EGF-podobne czynniki wzrostowe i ich udział w procesach regeneracji naskórka. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 111-133.
[24] Krajewska WM, Masłowska I. Kaweolina, kaweole i transformacja nowotworowa. *Post Biol Kom* 2004; **33**: 85-100.
[25] Lajoie P, Partridge EA, Guay G, Goetz JG, Pawling J, Lagana A, Joshi B, Dennis JW, Nabi IR. Plasma membrane domain organization regulates EGFR signaling in tumor cells. *J Cell Biol* 2007; **179**: 341-356.
[26] Lau KS, Dennis JW. N-Glycans in cancer progression. *Glycobiology* 2008; **18**: 750-760.
[27] Lin MC, Huang MJ, Liu CH, Yang TL, Huang MC. GALNT2 enhances migration and invasion of oral squamous cell carcinoma by regulating EGFR glycosylation and activity. *Oral Oncol* 2014; **50**: 478-484.
[28] Liu YC, Yen HY, Chen CY, Chen CH, Cheng PF, Juan YH, Chen CH, Khoo KH, Yu CJ, Yang PC, Hsu TL, Wong CH. Sialylation and fucosylation of epidermal growth factor receptor suppress its dimerization and activation in lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**: 11332-11337.
[29] Marcoux N, Vuori K. EGF receptor mediates adhesion-dependent activation of the Rac GTPase: a role for phosphatidylinositol 3-kinase and Vav2. *Oncogene* 2003; **22**: 6100-6106.
[30] Maruyama IN. Mechanisms of activation of receptor tyrosine kinases: monomers or dimers. *Cells* 2014; **3**: 304-330.
[31] Miyoshi E, Terao M, Kamada Y. Physiological roles of N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) in mice. *BMB Rep* 2012; **45**: 554-559.
[32] Normanno N, de Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, de Feo G, Caponigro F, Salomon DS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006; **366**: 2-16.
[33] Nowak JZ, Zawilska JB. Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. *Wydawnictwo Naukowe PWN*, Warszawa, 2004.
[34] Partridge EA, le Roy C, di Guglielmo GM, Pawling J, Cheung P, Granovsky M, Nabi IR, Wrana JL, Dennis JW. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science* 2004; **306**: 120-124.
[35] Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 2015; **15**: 540-555.

[36] Pokrywka M, Lityńska A. Budowa i funkcje biologiczne galektyny-3. Część II. *Biol Kom* 2010; **37**: 685-697.
[37] Rebbaa A, Yamamoto H, Saito T, Meuillet E, Kim P, Kersey DS, Bremer EG, Taniguchi N, Moskal JR. Gene transfection-mediated overexpression of beta1,4-acetylglucosamine bisection oligosaccharides in glioma cell line U373 MG inhibits epidermal growth factor receptor function. *J Biol Chem* 1997; **272**: 9275-9279.
[38] Sasaki T, Hiroki K, Yamashita Y. The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment. *Biomed Res Int* 2013; **2013**: 546318.
[39] Sato Y, Takahashi M, Shibukawa Y, Jain SK, Hamaoka R, Miyagawa JI, Yaginuma Y, Honke K, Ishikawa M, Taniguchi N. Overexpression of N-acetyloglucosaminotransferase III enhances the epidermal growth factor-induced phosphorylation of ERK in HeLaS3 cells by up-regulation of the internalization rate of the receptors. *J Biol Chem* 2001; **276**: 11956-11962.
[40] Schneider MR, Werner S, Paus R, Wolf E. Beyond wavy hairs: the epidermal growth factor receptor and its ligands in skin biology and pathology. *Am J Pathol* 2008; **173**: 14-24.
[41] Sethi MK, Kim H, Park CK, Baker MS, Paik YK, Packer NH, Hancock WS, Fanayan S, Thaysen-Andersen M. In-depth N-glycome profiling of paired colorectal cancer and non-tumorigenic tissues reveals cancer-, stage- and EGFR-specific protein N-glycosylation. *Glycobiology* 2015; **25**: 1064-1078.
[42] Slieker LJ, Martensen TM, Lane MD. Synthesis of epidermal growth factor receptor in human A431 cells. *J Biol Chem* 1986; **32**: 15233-15241.
[43] Soderquist AM, Carpenter G. Glycosylation of the epidermal growth factor receptor in A-431 cells. The contribution of carbohydrate to receptor function. *J Biol Chem* 1984; **259**: 12586-12594.
[44] Song Y, Aglipay JA, Bernstein JD, Goswami S, Stanley P. The bisecting GlcNAc on N-glycans inhibits growth factor signaling and retards mammary tumor progression. *Cancer Res* 2010; **70**: 3361-3371.
[45] Stroop CJ, Weber W, Gerwig GJ, Nimtz M, Kamerling JP, Vliegenthart JF. Characterization of the carbohydrate chains of the secreted form of the human epidermal growth factor receptor. *Glycobiology* 2000; **10**: 901-917.
[46] Surman M, Janik M. Regulacja procesu glikozylacji białek przez kaskadę cAMP. *Post Biochem* 2014; **60**: 305-312.
[47] Takahashi M, Kuroki Y, Ohtsubo K, Taniguchi N. Core fucose and bisecting GlcNAc, the direct modifiers of the N-glycan core: their functions and target proteins. *Carbohydr Res* 2009; **344**: 1387-1390.
[48] Takahashi M, Tsuda T, Ikeda Y, Honeko K, Taniguchi N. Role of N-glycans in growth factor signaling. *Glycoconj J* 2004; **20**: 207-212.
[49] Takahashi M, Yokoe S, Asahi M, Lee SH, Li W, Osumi D, Miyoshi E, Taniguchi N. N-glycan of ErbB family plays a crucial role in dimer formation and tumor promotion. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1780**: 520-524.
[50] Taniguchi N, Ihara S, Saito T, Miyoshi E, Ikeda Y, Honke K. Implication of GnT-V in cancer metastasis: a glycomic approach for identification of a target protein and its unique function as an angiogenic cofactor. *Glycoconj J* 2001; **18**: 859-865.
[51] Tomas A, Futter CE, Eden ER. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol* 2014; **24**: 26-34.
[52] Tsuda T, Ikeda Y, Taniguchi N. The Asn-420-linked sugar chain in human epidermal growth factor receptor suppresses ligand-independent spontaneous oligomerization. Possible role of a specific sugar chain in controllable receptor activation. *J Biol Chem* 2000; **275**: 21988-21994.
[53] Wang Y, Fukuda T, Isaji T, Lu J, Gu W, Lee HH, Ohkubo Y, Kamada Y, Taniguchi N, Miyoshi E, Gu J. Loss of α1,6-fucosyltransferase suppressed liver regeneration: implication of core fucose in the regulation of growth factor receptor-mediated cellular signaling. *Sci Rep* 2015; **5**: 8264.
[54] Wang X, Gu J, Ihara H, Miyoshi E, Honke K, Taniguchi N. Core fucosylation regulates epidermal growth factor receptor-mediated intracellular signaling. *J Biol Chem* 2006; **281**: 2572-2577.
[55] Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; **31**: 637-643.
[56] Wojtukiewicz MZ, Rybałtowski M, Sierko E. Podstawy biologiczne terapii ukierunkowanej na receptor czynnika wzrostu naskórka (EGFR). *Nowotwory J Oncol* 2008; **58**: 260-271.

[57] Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Szambora P. Patofizjologiczne podstawy terapii ukierunkowanej na zahamowanie funkcji receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFR). *Onkol Prakt Klin* 2010; **6**: 217-227.
[58] Yan M, Parker BA, Schwab R, Kurzrock R. HER2 aberrations in cancer: implications for therapy. *Cancer Treat Rev* 2014; **40**: 770-780.
[59] Ząbczyńska M, Pocheć E. Rola glikozylacji białek układu odpornościowego. *Post Biochem* 2015; **61**: 129-137.
[60] Zhao YY, Takahashi M, Gu JG, Miyoshi E, Matsumoto A, Kitazume S, Taniguchi N. Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. *Cancer Sci* 2008; **99**: 1304-1310.
[61] Zhen Y, Caprioli RM, Staros Jn. Characterization of glycosylation sites of the epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 2003; **42**: 5478-5492.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 25.10.2015
Przyjęto: 04.03.2016
Ewa Pocheć
Zakład Biochemii Glikokoniugatów
Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
tel.: (12) 664 64 67
e-mail: ewa.pochec@uj.edu.pl