



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**Dipartimento di Neuroscienze**

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E  
SPERIMENTALI INDIRIZZO NEUROSCIENZE  
XX CICLO

**STUDIO MOLECOLARE DEI DIFETTI DI GLICOSILAZIONE  
DELL'ALFA DISTROGLICANO IN PAZIENTI AFFETTI DA  
DISTROFIA MUSCOLARE CONGENITA E  
DISTROFIA MUSCOLARE DEI CINGOLI**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Silvano Todesco

**Supervisore:** Ch.ma Prof.ssa Elena Pegoraro

**Dottorando:** Dr. Raffaele Pezzani



## RIASSUNTO

Le distrofie muscolari sono un gruppo di malattie clinicamente e genotipicamente eterogenee, caratterizzate da debolezza muscolare progressiva.

Il quadro istopatologico è vario ed include forme di miopatia lieve o forme di distrofia muscolare severa con degenerazione, rigenerazione e sostituzione fibro-adiposa.

L'eziopatogenesi di molte distrofie muscolari coinvolge alterazione degli elementi costituenti la membrana basale e il citoscheletro della fibra muscolare. Un ruolo prominente di stabilizzazione della membrana è svolto dal complesso di glicoproteine associate alla distrofina (DGC). Questo complesso multimerico (DGC) è formato da distrofina, sarcoglicani, distrobrevine, sintrofine, sarcospan, e distroglicano. Il distroglicano è una glicoproteina, codificata da un unico gene *DAG1*, il cui prodotto viene post-traduzionalmente clivato in 2 subunità,  $\alpha$ -distroglicano e  $\beta$ -distroglicano. Il distroglicano garantisce la connessione e la stabilità tra gli elementi del citoscheletro e la matrice extracellulare ed è espresso in un'ampia varietà di tessuti, quali muscolo scheletrico e cardiaco, sistema nervoso centrale e periferico ed epitelii.

L' $\alpha$ -distroglicano è una proteina periferica di membrana altamente glicosilata, che lega diverse molecole (laminina, agrina, perlecani, neurexina, biglicani) e che interagisce intimamente con la porzione extracellulare del  $\beta$ -distroglicano. Quest'ultimo è in grado di connettersi nel citoplasma con la distrofina, la caveolina-3 e ancora altre proteine coinvolte nella trasduzione del segnale. Il peso molecolare previsto per l' $\alpha$ -distroglicano è di circa 72 kDa, ma vi è una certa eterogeneità in questa misura, poiché ad esempio nel tessuto muscolare l' $\alpha$ -distroglicano, a causa della glicosilazione, presenta un peso molecolare apparente di 156 kDa.

Mentre non si conoscono malattie neuromuscolari associate a mutazioni dirette del distroglicano, è ormai evidente l'importanza dei processi post-traduzionali coinvolgenti tale proteina nella

patogenesi di molte distrofie muscolari. In particolare la glicosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano ha una funzione critica per il mantenimento dell'integrità delle proteine della matrice extracellulare.

Alterazioni di glicosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano danno origine ad un gruppo di distrofie muscolari autosomiche recessive, definite come distroglicanopatie.

Le distroglicanopatie presentano forte eterogeneità fenotipica: si passa dalle forme più severe ad esordio congenito come Walker-Warburg Syndrome (WWS), Muscle-Eye-Brain (MEB), Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD), MDC1C, a forme più lievi come le distrofie muscolari dei cingoli (LGMD). Geneticamente, le distroglicanopatie sono causate da mutazioni in almeno 6 geni fino ad oggi conosciuti: *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *Fukutin*, *LARGE*, *FKRP*. Tutti codificano per glicosiltransferasi putative o accertate.

Scopo del presente lavoro è la caratterizzazione di un vasto gruppo di pazienti con distrofie muscolari congenite e dei cingoli ad eziopatogenesi sconosciuta, nel tentativo di ampliare le correlazioni tra il rapporto tra genotipo e fenotipo. Ed infatti una corretta diagnosi molecolare rappresenta la base di ulteriori studi volti all'identificazione di nuove strategie terapeutiche.

#### Criteri di selezione

Il gruppo di pazienti da analizzare è stato selezionato dalla banca dati delle biopsie muscolari del Centro delle Malattie Neuromuscolari, Dipartimento di Neuroscienze, Università di Padova, che comprende oltre 8000 campioni. I 234 pazienti dello screening rispondono ad uno dei seguenti criteri: a) presentano distrofia muscolare congenita o dei cingoli ad eziologia sconosciuta, b) valori di CK fluttuanti, debolezza durante stati febbrili, responsività agli steroidi.

#### Immunoistochimica

L'immunoistochimica è stata effettuata su 234 biopsie muscolari. Le sezioni di tessuto sono state tagliate al criostato ed è stato utilizzato un anticorpo diretto contro un epitopo dell' $\alpha$ -distroglicano (IIH6C4 - Upstate Biotechnology).

## Immunoblot

L'immunoblot è stato eseguito sui 94 campioni risultati deficitari di  $\alpha$ -dystroglicano in immunohistochimica. L'analisi ha evidenziato la fedele corrispondenza tra i dati di immunohistochimica e di immunoblot.

## Studio di mutazione

I pazienti analizzati sono stati 94, ed in questi sono state identificate 26 mutazioni patogenetiche totali. Il 73% dei pazienti risultava possedere un deficit parziale di  $\alpha$ -dystroglicano, mentre il 27% dei pazienti evidenziava un deficit totale di  $\alpha$ -dystroglicano (pattern immunohistochimico e di immunoblot). Il dato finale che si ricava dallo studio di mutazione esprime un tasso di mutazione pari al 28% (26 pazienti mutati su 94 pazienti con deficit di  $\alpha$ -dystroglicano), che può essere suddiviso in a) 24% se si esamina il tasso di mutazione all'interno del gruppo di pazienti parzialmente deficitari, o in b) 46% se si considera il gruppo di pazienti totalmente deficitari.

Concludendo negli ultimi anni è diventato sempre più evidente come l' $\alpha$ -dystroglicano sia una molecola chiave nel complesso di glicoproteine associate alla dystrofina (DGC), che permette la connessione e garantisce la stabilità tra gli elementi del citoscheletro e la matrice extracellulare. Inoltre la *O*-glicosilazione dell' $\alpha$ -dystroglicano è un processo altamente strategico, comprendendo il quale sarà possibile lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici. Infatti i processi post-traduzionali che alterano la glicosilazione di questa proteina sono alla base della patogenesi di molte distrofie muscolari ed in particolare delle dystroglicanopatie. Il tasso di mutazione trovato nel gruppo di pazienti con deficit di  $\alpha$ -dystroglicano è di circa il 26%, mentre sale a circa il 50% nei pazienti con deficit totale di  $\alpha$ -dystroglicano. Il presente lavoro conferma l'elevata eterogeneità genotipica e fenotipica caratteristica delle dystroglicanopatie ed amplia lo spettro fenotipico ad esse legato.

## SUMMARY

Muscular dystrophies are a group of diseases genotypically and clinically heterogeneous, characterized by progressive muscular weakness.

The histopathologic profile can vary from mild to severe myopathy, with degeneration, regeneration and adipose-fiber substitution.

Muscular dystrophy etiopathogenesis involves basal membrane elements and muscle fiber cytoskeleton alterations. A prominent role is played by the dystrophin glycoprotein complex (DGC), which provides a strong stabilization link between the intracellular cytoskeleton and extracellular matrix. The DGC is composed by dystrophin, sarcoglycans, distrobrevins, sintrophins, sarcospan and dystroglycan. Dystroglycan is a glycoprotein, encoded by one gene *DAG1*, that is post-translationally cleaved into 2 subunits,  $\alpha$ -dystroglycan and  $\beta$ -dystroglycan. The dystroglycan ensure connection and stability and is expressed in a large variety of tissue, including skeletal and cardiac muscle, central and peripheral nervous system tissue and epithelia.

$\alpha$ -DG is a highly glycosylated peripheral membrane protein, which binds to several molecules (laminin, agrin, perlecan, neurexin, biglycan) and tightly interacts with the extracellular portion of  $\beta$ -DG.  $\beta$ -DG has the ability to connect to the cytoplasmic domain of dystrophin, to caveolin-3 and other proteins implicated in signal trasduction. The predicted molecular weight of  $\alpha$ -dystroglycan is about 72 kDa, but can vary due to glycosylation. In fact  $\alpha$ -dystroglycan has an apparent molecular weight of 156 kDa in skeletal muscle.

So far no pathogenic mutations have been identified in genes encoding for dystroglycan. It is clear that the pathogenesis of in muscular dystrophy involves post-translational processing events that are important for the interaction of dystroglycan with its ligands. In particular  $\alpha$ -dystroglycan glycosylation has a critical role in maintaining integrity of extracellular matrix proteins.

Alterations in  $\alpha$ -dystroglycan glycosylation lead to a particular group of recessive autosomic muscular dystrophy called dystroglycanopathies.

The dystroglycanopathies show strong phenotypic heterogeneity: in fact at the most severe end of the clinical spectrum are Walker-Warburg Syndrome (WWS), Muscle-Eye-Brain (MEB), Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD), MDC1C. At the mild end there is Limb-Girdle muscular dystrophy (LGMD). Genetically, dystroglycanopathies are caused by mutations in 6 known genes: *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *Fukutin*, *LARGE*, *FKRP*. All these genes encode for putative or known glycosyltransferases.

This present work intends to characterize a large group of patients affected by congenital or limb-girdle muscular dystrophy with unknown etiopathogenesis, trying to extend genotype and phenotype correlations. In fact a precise molecular diagnosis will provide an essential basis for further studies leading to identification of new therapeutic strategies.

#### Selection criteria

Patient groups are sorted from the muscular biopsy database “Centro delle Malattie Neuromuscolari”, Department of Neuroscience, University of Padova, which comprises over 8000 samples. In order to be selected, each patient must meet one of these criteria: a) be affected by congenital muscular dystrophy or limb-girdle muscular dystrophy with unknown etiopathogenesis, b) have floating CK values, weakness during fever or steroid responsiveness. 234 patients were selected for screening.

#### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on 234 muscular biopsies. Cryosections were incubated with an antibody directed to the  $\alpha$ -dystroglycan epitope (IIH6C4 - Upstate Biotechnology).

#### Immunoblot

Immunoblot was performed on 94 samples, with reduced  $\alpha$ -dystroglycan glycosylation in immunohistochemistry. The analysis shows exact congruence between immunohistochemistry and immunoblot data.

#### Mutation analysis

Of 94 analyzed patients, 26 were identified as having pathogenic mutations. 73% of patients showed reduced  $\alpha$ -dystroglycan glycosylation, while 27% of patients exhibited total absence of  $\alpha$ -dystroglycan glycosylation (in immunohistochemistry and immunoblot). The data set obtained by mutation analysis lead to a general mutation rate of 28% (26 patients out of 94 patients with  $\alpha$ -dystroglycan deficit) and can be subdivided as a) 24% if mutation rate is examined inside partially deficit patient group, or in b) 46% if mutation rate is considered inside totally deficit patient group.

In conclusion, in the last few years it has become more and more evident that  $\alpha$ -dystroglycan play a pivotal role in the dystrophin glycoprotein complex (DGC), permitting connection and assuring stability between the intracellular cytoskeleton and extracellular matrix. Moreover a better understanding of  $\alpha$ -dystroglycan *O*-glycosylation could lead to the development of new therapeutic approaches. In fact, post-translational processes that alter dystroglycan glycosylation are the basis of muscular dystrophy pathogenesis, principally dystroglycanopathy. The mutation rate found in our patients (with  $\alpha$ -dystroglycan deficit) is about 26%, which an incidence of 50% in patients with total absence of  $\alpha$ -dystroglycan. This work confirms high genotypic and phenotypic heterogeneity of dystroglycanopathy and the wide phenotypic spectrum related to these disorders.

## INTRODUZIONE

Le distrofie muscolari sono un gruppo di malattie clinicamente e genotipicamente eterogenee, caratterizzate da debolezza muscolare progressiva.

Il quadro istopatologico è vario ed include forme di miopatia lieve o forme di distrofia muscolare severa con degenerazione, rigenerazione e sostituzione fibro-adiposa.

L'eziopatogenesi di molte distrofie muscolari coinvolge l'alterazione degli elementi costituenti la membrana basale e il citoscheletro della fibra muscolare. Una funzione prominente in questo senso è svolta dal complesso multimerico DGC (dystrophin-associated glycoprotein complex), tra cui si ritrova il distroglicano, che numerose evidenze sperimentali indicano agire come stabilizzatore della membrana durante la contrazione muscolare, in modo da connettere la matrice extracellulare con il citoscheletro. Questo complesso multimerico è formato da distrofina, sarcoglicani, distrobrevine, sintrofine, sarcospan, e distroglicano (Endo et al., 2003, Barresi et al., 2005) (Fig. n°1).

Il distroglicano è una glicoproteina, codificata da un unico gene *DAG1*, il cui prodotto viene post-traduzionalmente clivato in 2 subunità,  $\alpha$ -distroglicano e  $\beta$ -distroglicano. Il distroglicano garantisce la connessione e la stabilità tra gli elementi del citoscheletro e la matrice extracellulare ed è espresso in un'ampia varietà di tessuti, quali muscolo scheletrico e cardiaco, sistema nervoso centrale e periferico ed epiteli (Sciandra et al., 2003).

L' $\alpha$ -distroglicano è una proteina periferica di membrana altamente glicosilata, che lega diverse molecole (laminina, agrina, perlecani, neurexina, biglicani) e che interagisce intimamente con la porzione extracellulare del  $\beta$ -distroglicano. Quest'ultimo è in grado di connettersi nel citoplasma con la distrofina, la caveolina-3 e ancora altre proteine coinvolte nella trasduzione del segnale. Il peso molecolare previsto per l' $\alpha$ -distroglicano è di circa 72 kDa, ma vi è una certa eterogeneità in questa misura, poiché ad esempio nel tessuto muscolare l' $\alpha$ -distroglicano, a causa della glicosilazione, presenta un peso molecolare apparente di 156 kDa (Barresi et al., 2005).

Mentre non si conoscono malattie neuromuscolari associate a mutazioni dirette del distroglicano, è ormai evidente l'importanza dei processi post-traduzionali coinvolgenti tale proteina nella patogenesi di molte distrofie muscolari. In particolare la glicosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano ha una funzione critica per il mantenimento dell'integrità delle proteine della lamina basale.

Alterazioni di glicosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano danno origine ad un gruppo di distrofie muscolari autosomiche recessive, definite come distroglicanopatie.

Le distroglicanopatie presentano forte eterogeneità fenotipica: si passa dalle forme più severe ad esordio congenito come Walker-Warburg Syndrome (WWS), Muscle-Eye-Brain (MEB), Fukuyama Congenital Muscular Dystrophy (FCMD), Congenital Muscular Dystrophy type 1C (MDC1C), a forme più lievi come Limb-Girdle Muscular Dystrophy (LGMD). Geneticamente, le distroglicanopatie sono causate da mutazioni in almeno 6 geni fino ad oggi conosciuti: *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *fukutin*, *LARGE*, *FKRP*. Tutti codificano per glicosiltransferasi putative o accertate (Godfrey et al. 2007).

### **Il distroglicano e il complesso multimerico DGC (dystrophin-associated glycoprotein complex)**

Il distroglicano è una glicoproteina espressa in molti tessuti, tra cui epitelio, sistema nervoso e muscolo cardiaco, e naturalmente nel muscolo scheletrico. Quindi, oltre ad avere un fondamentale ruolo nel mantenimento e nella formazione del muscolo, la sua presenza risulta indispensabile anche in altri distretti dell'organismo. È costituito da un complesso di 2 subunità,  $\alpha$  e  $\beta$  distroglicano ed ha la funzione principe di connessione tra citoscheletro e matrice extracellulare, con l' $\alpha$ -distroglicano che fa da ponte tra la laminina della lamina basale e con il  $\beta$ -distroglicano (proteina transmembrana) che lega la distrofina nel citoscheletro (Ervasti et al., 1993; Bowe et al., 1994; Peng et al., 1998).

In letteratura state trovate diverse mutazioni a carico di vari componenti del complesso del distroglicano, ma non sono attualmente riportate mutazioni coinvolgenti il gene del distroglicano.

Infatti esperimenti condotti su modelli animali hanno evidenziato come il topo knockout per *DAG1* arresti il suo sviluppo ai primi stadi embrionali (Williamson et al., 1997).

Il complesso multimerico DGC (Fig. n° 2) (dystrophin-associated glycoprotein complex) è formato da diverse proteine (Ohlendieck et al., 1993, Crosbie et al., 1997, Blake 2002, Banks et al., 2003):

- a) distrofina - connessa intracellularmente al  $\beta$ -dystroglicano, alla ossido nitrico sintetasi (nNOS) e all'actina F del citoscheletro - la cui assenza o riduzione è implicata nella distrofia muscolare di Duchenne o di Becker;
- b) sarcoglicani - ossia  $\alpha$ -sarcoglicano,  $\beta$ -sarcoglicano,  $\gamma$ -sarcoglicano,  $\delta$ -sarcoglicano, associati anche alla distrofina formano a loro volta un complesso multimerico - sono imputati nelle sarcoglicanopatie;
- c) distrobrevine - proteine omologhe alla distrofina, con cui interagiscono - suddivise in  $\alpha$ -distrobrevina, di cui si conoscono 5 isoforme e  $\beta$ -distrobrevina, espressa in tessuti non muscolari;
- d) sintrofine - anch'esse associate alla distrofina e alle distrobrevine - espresse in periodi specifici dello sviluppo e non sempre in tutto il sarcolemma;
- e) sarcospan - che si lega strettamente al complesso dei sarcoglicani - formato da 4 eliche transmembrana;
- f) dystroglicano, che costituisce il nucleo del complesso.

### **$\alpha$ e $\beta$ dystroglicano**

Il dystroglicano è un propeptide di 895 aminoacidi (Fig. 3), codificato da un unico gene (*DAG1*) che viene rapidamente separato in 2 subunità  $\alpha$  e  $\beta$ . Il taglio post-traduzionale del precursore avviene al residuo Ser 654 (Ibraghimov-Beskrovnyaya et al. 1992). L' $\alpha$ -dystroglicano è una proteina extracellulare, a cui si legano numerose altre molecole extracellulari, quali laminina (nella lamina

basale), agrina e perlecano nel muscolo (2 proteoglicani eparan-solfati), biglicano nella matrice extracellulare (un proteoglicano condroitin-solfato) e neurexina nel cervello. È una proteina altamente glicosilata, la cui forma ricorda un manubrio, che può essere strutturalmente suddivisa in 3 porzioni: il dominio N-terminale e il dominio C-terminale - entrambi a struttura globulare - e un dominio centrale mucinico (mucin-like domain). Una funzione fondamentale è svolta da quest'ultimo dominio (ricco in prolina, serina e treonina), a cui si legano le catene oligosaccaridiche, che a loro volta mediano i legami con le molecole extracellulari sopra ricordate. Recentemente inoltre è stato evidenziato come anche il dominio N-terminale, benché sia escisso nella proteina matura, sia comunque indispensabile per il riconoscimento da parte di LARGE (glicosiltransferasi putativa) del distroglicano come substrato. Il dominio C-terminale è invece unito non covalentemente al  $\beta$ -distroglicano grazie ad una porzione di 36 aminoacidi altamente conservati (Chiba et al. 1997, Sciandra et al., 2001, Bozzi et al., 2001, Kanagawa et al. 2004).

L'atteso peso molecolare dell' $\alpha$ -distroglicano si aggira attorno a 72 kDa e in immunoblot si ha un peso variabile da 156 kDa nel muscolo scheletrico, a 140 nel cuore a 120 kDa nel cervello e nervo periferico (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992, Yamada et al., 1994, Leschziner et al., 2000).

Questa alta variabilità della massa molecolare dell' $\alpha$ -distroglicano risulta probabilmente una conseguenza della diversa *O*-glicosilazione nel dominio mucinico dei tessuti scheletrico, cardiaco e cerebrale, oltre che conseguenza della specie e della fase di sviluppo dell'organismo (Ervasti et al., 1991, Sasaki et al., 1998).

Oltre alla mera funzione strutturale, si è inoltre osservato che l' $\alpha$ -distroglicano possiede un ruolo come recettore cellulare ed infatti può agire come recettore comune per virus e batteri (come Arenavirus e *Mycobacterium leprae*), solo però se la proteina nativa si conserva inalterata. Al contrario, la proteina ricombinante non ha la stessa attività, poiché non è mantenuta la naturale glicosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano (Cao et al., 1998, Rambukkana et al., 1998).

In più è associato alla progressione di tumori epiteliali (prostata e seno), dove il gene *DAG1* è normalmente espresso, ma la glicosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano è ridotta e correla con un più alto

grado di malignità. È evidente che la perturbazione dello stretto legame formato dal distroglicano e la matrice cellulare non solo facilita l'azione delle cellule tumorali, ma concorre anche allo sviluppo di severe malattie congenite, quali le distrofie muscolari (Henry et al., 2001, Muschler et al., 2000, Sgambato et al., 2003).

Il  $\beta$ -distroglicano è una proteina transmembrana con peso molecolare di 43 kDa che si lega intracellularmente, grazie ai numerosi residui prolinici che facilitano l'interazione proteina-proteina, a (Henry et al., 1999, Banks et al., 2003, Hayashi 2003):

- a) distrofina, la quale a sua volta si connette al citoscheletro per mezzo dell'actina;
- b) utrofina, proteina omologa della distrofina, nei tessuti non muscolari;
- c) rapsina, una proteina post-sinaptica deputata alla stabilizzazione e promozione dei clusters di AChR;
- d)  $\alpha$ -distrobrevina, che contiene un dominio EF-hand, struttura ritrovata in una grande famiglia di proteine che legano il calcio;
- e) caveolina-3, proteina localizzata nel muscolo che contribuisce alla formazione delle caveolae, microscopiche strutture la cui funzione è legata al trasporto attraverso la membrana cellulare di sostanze necessarie per il metabolismo della cellula;
- f) Grb2, una proteina coinvolta sia nella comunicazione cellulare che nella trasduzione del segnale.

A livello di membrana, il  $\beta$ -distroglicano si connette con il suo unico dominio transmembrana con i sarcoglicani, mentre extracellularmente si connette all' $\alpha$ -distroglicano. La sua coda C-terminale ricca in prolina contiene un motivo PPXY (prolina prolina X tirosina) che si lega a un dominio contenente triptofano (WW domain) presente nella distrofina, stabilizzata da 2 domini EF-hand leganti il calcio. Inoltre il  $\beta$ -distroglicano sembra essere coinvolto nella trasduzione del segnale a causa della presenza nella sequenza aminoacidica di 2 potenziali domini non catalitici SH2 e SH3, il primo implicato nella trasformazione cellulare e nella normale trasduzione del segnale (si lega a

polipeptidi con gruppi tirosinici fosforilati), il secondo modula invece le interazioni tra citoscheletro e membrana (Kock et al., 1991, Jung et al. 1995, James et al., 2000, Sotgia et al., 2001).

### **Glicosilazione dell'alfa-distroglicano**

La maggior parte delle proteine degli esseri viventi contiene catene glucidiche, biosegnali fondamentali per la comunicazione intra ed extracellulare, per il targeting citoplasmatico di proteine e per il ripiegamento dei peptidi. È evidente come queste porzioni glucidiche risultino di conseguenza coinvolte in numerosi processi cellulari, come possono essere la differenziazione cellulare, lo sviluppo, ecc. Per gestire la glicosilazione delle proteine, la cellula si appoggia sia al controllo dell'espressione delle glicosiltransferasi (gli enzimi direttamente coinvolti nel montaggio dei residui glucidici) che dei loro substrati specifici. Tra i glucidi osservati nelle glicoproteine si annoverano diverse specie chimiche come il glucosio, il galattosio, il mannosio, il fucosio, l'acido sialico, la glucosammina, la galattosiammina, e lo xilosio (Endo et al., 2003).

Per semplicità si possono suddividere le catene glucidiche legate alle proteine in 2 grandi raggruppamenti:

- a) *N*-glicani, catene glucidiche connesse al gruppo  $\text{NH}_2$  dell'aminoacido asparagina. La *N*-glicosilazione (nome del processo attraverso il quale si legano questo tipo di zuccheri) inizia nel reticolo endoplasmatico rugoso ed ha come bersaglio una nuova catena peptidica in corso di traduzione. Il legame riguarda l'*N*-acetil glucosammina (GluNAc), con lo zucchero in configurazione  $\beta$ , e il corretto sito per questo legame è segnalato da una serina o una treonina di un aminoacido a valle rispetto all'asparagina del legame glicosidico. La prima fase consiste nel montaggio di una catena di 14 zuccheri (9 di mannosio, 3 di glucosio e 2 di *N*-acetilglucosammina) sulla proteina (gli oligosaccaridi sono assemblati a partire da singoli carboidrati). In un secondo tempo la catena di zuccheri è trasferita sulla proteina dall'enzima glicosiltransferasi, grazie al trasportatore dolicolo fosfato. Infine la proteina viene

completata nell'apparato di Golgi dove viene riconosciuta e modificata, con aggiunte o rimozioni di singoli zuccheri o di catene glucidiche più lunghe, in base alla futura funzione (Muntoni et al., 2004);

- b) *O*-glicani, catene glucidiche connesse a residui di idrossilisina, idrossiprolina, serina o treonina. La *O*-glicosilazione (nome del processo attraverso il quale si legano questo tipo di zuccheri) è un processo altamente specifico, a differenza della *N*-glicosilazione, e non prevede l'aggiunta in stretta e definita sequenza di zuccheri alla proteina in processazione. Il legame riguarda l'*N*-acetil galattosamina (GalNAc), che è attaccata al gruppo idrossilico degli aminoacidi sopra menzionati, ed avviene completamente nell'apparato di Golgi con lo zucchero in configurazione  $\alpha$  (Peter-Katalinić, 2003, Barresi et al., 2005).

Tra i processi di *O*-glicosilazione si ritrovano la *O*-fucosilazione, la *O*-mannosilazione, la *O*-glucosilazione e altri ancora. La *O*-mannosilazione è un raro processo post-trascrizionale che coinvolge direttamente la glicosilazione del distroglicano. Inizialmente la *O*-mannosilazione era stata limitata ai lieviti e ad alcuni funghi. Solo più recentemente si è scoperta la sua importanza anche tra i mammiferi, relativamente ad alcune proteine del muscolo scheletrico, del cervello e dei nervi. Una fondamentale proteina *O*-mannosilata è l' $\alpha$ -distroglicano, il cui dominio mucinico viene aggiunto di diversi residui glucidici terminanti con fucosio o acido sialico (Fig. n°4). La struttura glucidica più presente e caratterizzata di questi residui è un tetrasaccaride (Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ -Ser/Thr, descritto nei mammiferi solo sull' $\alpha$ -distroglicano), che possiede un ruolo fondamentale nel gestire l'interazione con la laminina. Esistono comunque diverse varianti strutturali del tetrasaccaride sopra descritto. L' $\alpha$ -distroglicano è provvisto, oltre che delle catene di mannosio sopra citate, anche della più comune *N*-acetilgalattosamina (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr) (Endo 2005, Sciandra et al., 2007).

## **Meccanismo molecolare delle $\alpha$ -dystroglicanopatie**

Le  $\alpha$ -dystroglicanopatie sono un gruppo eterogeneo clinicamente e geneticamente di distrofie muscolari autosomiche recessive, definite da ridotta o assente glicosilazione dell' $\alpha$ -dystroglicano.

Così nominate per la prima volta nel lavoro di Toda (Toda et al. 2003) sono caratterizzate da enzimi, la cui funzione di glicosilazione a livello del substrato risulta alterata, in grado di modificare direttamente o indirettamente le catene di mannosio dell' $\alpha$ -dystroglicano.

L'ipoglicosilazione del dystroglicano comporta necessariamente delle notevoli trasformazioni a livello del complesso multimerico DGC. Queste modificazioni danno come risultato a livello molecolare una minore affinità con i suoi naturali ligandi (laminina, argina, ecc.), e di conseguenza una minore stabilità dell'intera struttura di connessione tra citoscheletro e lamina basale.

La destabilizzazione di questa fondamentale struttura causa l'ingresso degli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  nel mioplasma, che a loro volta innescano una cascata reattiva che conduce alla necrosi cellulare (Ohlendieck et al., 1993, Ohlendieck, 1996).

Fenotipicamente le alterazioni si manifestano con un ampio range di segni clinici, passando da forme relativamente miti senza coinvolgimento di occhi e cervello, LGMD, a forme più severe come WWS, MEB, FCMD (Godfrey et al. 2007).

La corretta glicosilazione del dystroglicano tramite cascata enzimatica e la specifica funzione delle sue catene glucidiche nelle interazioni con i ligandi sono ancora oggi oggetto di intenso studio.

L'aberrante glicosilazione del dystroglicano dovuta a difetti genetici nei geni codificanti per glicosiltransferasi può comportare difetti muscolari e anomalie cerebrali. Si è a conoscenza che le glicosiltransferasi, coinvolte nell'aggiunta di residui glucidici sull' $\alpha$ -dystroglicano, che agiscono tramite *O*-mannosilazione e di cui si conoscono i substrati, sono 3: POMT1, POMT2, POMGnT1. Questi enzimi presenti nel reticolo endoplasmatico sono stati caratterizzati molecularmente e biochimicamente (Yoshida et al., 2001, Manya et al., 2003, Akasaka-Manya et al., 2004). Esistono poi altre 3 glicosiltransferasi putative, i cui geni sono *fukutin*, *FKRP*, *LARGE*. Gli enzimi fukutin, *FKRP*, *LARGE* sono stati scoperti per omologia di sequenza, ma attualmente mancano conoscenze

approfondite circa il o i loro substrati molecolari (de Paula et al., 2003, Brown et al., 2004, Brockington et al., 2005, Xiong et al., 2006).

### **I 6 geni coinvolti nelle $\alpha$ -distroglicanopatie**

Le mutazioni nei 6 geni oggi conosciuti (*POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *fukutin*, *LARGE*, *FKRP*) danno origine a varie forme di distrofie muscolari dei cingoli e a varie forme di distrofie muscolari congenite. Nella prima letteratura si riteneva che le mutazioni in ogni singolo gene fossero connesse ad un determinato fenotipo clinico. Più recentemente si è capito che le mutazioni in quasi tutti questi geni generano fenotipi che si sovrappongono facilmente, sia per quanto concerne la loro severità clinica che il loro quadro clinico (Martin 2005).

Il gene *POMT1* (protein *O*-mannosyltransferase 1) è responsabile di diverse malattie, in particolare mutazioni nella sua sequenza nucleotidica originano WWS, MEB, FCMD, CMD e LGMD. Anche i geni mutati *POMT2*, *FKRP*, *POMGnT1* presentano la stessa eterogenicità clinica evidenziata da *POMT1*, essendo coinvolti nelle varie distrofie muscolari sopra ricordate (WWS, MEB, FCMD, CMD e LGMD). Diversamente il gene *fukutin* sembra dare luogo solo ai fenotipi WWS, FCMD e LGMD2L e il gene *LARGE* a WWS e MDC1C (Barresi et al., 2005, Godfrey et al., 2007).

### **Distrofie muscolari congenite**

Già dall'inizio del ventesimo secolo sono stati descritti casi di miopatia congenita, ma a causa della carenza delle indagini anatomico-patologiche. Solo nel 1957 Banker e colleghi descrissero 2 casi affetti da distrofia muscolare congenita con artrogriposi, avvalendosi di idonee indagini anatomico-patologiche che rivelavano degenerazione delle fibre muscolari, variabilità della dimensione delle fibre, fibrosi e sostituzione adiposa, mentre il sistema nervoso centrale e periferico erano intatti (Banker et al., 1957).

Le distrofie muscolari congenite sono un gruppo di malattie autosomiche recessive clinicamente eterogenee, caratterizzate da debolezza muscolare diffusa, spesso simmetrica e prevalentemente prossimale con vari gradi di severità. L'evoluzione è variabile, così come l'interessamento dell'apparato respiratorio del cuore. Spesso presentano ritardo mentale e difetti dell'anatomia cerebrale e dell'occhio. Esordiscono solitamente entro il primo anno di vita e sono relativamente frequenti nella popolazione (Miyagoe-Suzuki et al. 2000). Tra le distrofie muscolari congenite ritroviamo FCMD (Fukuyama congenital muscular dystrophy), MEB (muscle-eye-brain disease) e WWS (Walker-Warburg Syndrome).

WWS è una distrofia che condivide con FCMD e MEB malformazioni cerebrali e oculari, a causa di un difetto nella migrazione neuronale. I geni mutati originariamente in associazione con WWS erano *POMT1* e *POMT2*, i cui prodotti enzimatici formano un eterodimero che catalizza la *O*-mannosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano (de Berbabè et al. 2002).

MEB è una malattia che rispecchia fortemente le caratteristiche di WWS, benchè MEB sembri essere la più letale, poiché i pazienti affetti non superano i 3 anni di vita. Fu originariamente descritta in una popolazione fillandese in associazione con mutazioni del gene *POMGnT1*, il cui prodotto è un enzima coinvolto nel trasferimento di *N*-acetilglucosamina sul residuo di mannosio tramite *O*-mannosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano (Yoshida et al., 2001).

FCMD simile fenotipicamente a WWS e MEB, è prevalentemente comune in Giappone (è la seconda distrofia muscolare più frequente dopo la distrofia muscolare di Duchenne), paese nel quale è stato evidenziato l'effetto fondatore. FCMD è causata dalla destabilizzazione prodotta dall'inserzione di un retrotrasposone nella regione 3' non tradotta del gene *FCMD*, che non può originare la glicosiltransferasi putativa FKNT (Kobayashi et al., 1998).

## **Distrofie muscolari dei cingoli**

Benché già individuate alla fine del diciannovesimo secolo, le distrofie muscolari dei cingoli sono state classificate provvisoriamente solo nel 1954, quando Walton e Nattrass coniarono il termine di “distrofia muscolare dei Cingoli” (LGMD) per definire pazienti con debolezza muscolare e atrofia dei muscoli prossimali del cingolo scapolare e pelvico, senza coinvolgimento della muscolatura facciale e con progressione moderatamente rapida, che presentavano esordio tardivo della malattia (Walton et al., 1954). La difficoltà di una classificazione univoca di distrofia dei cingoli è presente sia nel passato, dove ci avvaleva solo di indagini anatomico-patologiche, che ai giorni nostri, dove l’eterogeneità della malattia, che include forme ad esordio al cingolo scapolare o pelvico, progressione rapida e lenta, è evidente anche a livello genetico (Bushby et al, 1995; Bushby, 1996). Le distrofie muscolari dei cingoli (LGMD) sono un ampio gruppo di distrofie muscolari caratterizzate da debolezza muscolare con diversa severità clinica e sono accomunate da un interessamento prevalente dei muscoli del cingolo pelvico e scapolare. L’evoluzione è piuttosto variabile, passando da forme con inizio nell’infanzia e decorso rapidamente progressivo fino a forme più miti dell’età adulta, con andamento lentamente progressivo nel corso di molti anni. Sono causate da anomalie genetiche che non permettono la corretta codifica di proteine essenziali per la contrazione muscolare. In letteratura sono presenti sia forme autosomico dominanti (LGMD tipo 1) che autosomico recessive (LGMD tipo 2) (Hewitt et al., 2003). Si conoscono ben 19 forme di LGMD e non è facile distinguere i vari sottotipi, anche perché i geni che codificano per i vari componenti del DGC appartengono a classi differenti (Bushby 1999, Lo et al., 2008). Infatti la diagnosi è una sintesi tra i dati di laboratorio (immunoistochimica, immunoblot, analisi di mutazione) e i dati clinici.

Tra le recessive è presente la forma mite LGMD2I, causata da mutazioni nel gene *FKRP* e quindi ricollegabile a un deficit nella glicosiltransferasi putativa FKRP (Fukutin-related protein), che sembra portare ad una diminuzione della glicosilazione dell’ $\alpha$ -dystroglicano. È interessante notare come il gene *FKRP* sia anche responsabile per la forma allelica MDC1C, una distrofia muscolare congenita severa, con insorgenza subito dopo la nascita, ipotonia, debolezza muscolare incapacità di

deambulazione. Inoltre la LGMD2I è anche una variante allelica delle MEB e WWS, distrofie congenite sopra ricordate (de Bernabé et al, 2003). Questo esempio mostra come i geni codificanti per le distrofie muscolari qui in esame diano origine a fenotipi differenti, sia miti che severi, diversamente da quanto riportato in letteratura nei primi lavori (Brockington et al., 2001, Balci et al., 2005, Godfrey et al., 2006). La LGMD2I è una malattia caratterizzata da ipotonia ad insorgenza nella prima infanzia. Talvolta c'è ipertrofia delle gambe e della lingua, cardiomiopatia e perdita della deambulazione in giovane età. In comune con MDC1C, si evidenzia nei pazienti intelligenza e RMN del cervello normale (de Paula et al., 2003). Sempre il gruppo di Muntoni ha identificato una mutazione ricorrente nel gene *FKRP*, la mutazione missenso C826A: risulta però degno di attenzione il fatto che pazienti omozigoti per questa variazione possiedono un fenotipo più mite rispetto a pazienti eterozigoti per la stessa variazione che manifestano un fenotipo più severo (Brockington et al., 2001). Anche altre forme recessive di LGMD vedono l'esistenza di un deficit di  $\alpha$ -dystroglicano. Ad esempio LGMD2K, è dovuta ad un danno genetico riconducibile alla glicosiltransferasi; invece LGMD2L sembra dovuta alla putativa glicosiltransferasi FKNT che mappa anch'essa sul cromosoma 9 (9q31-q33); LGMD2M è causata da difetti genetici ascrivibili alla glicosiltransferasi POMGnT1 (protein *O*-mannose-beta1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1) che mappa sul cromosoma 1 (1p34.1); infine LGMD2N determinata da anomalie genetiche nella glicosiltransferasi POMT2 (protein *O*-mannosyltransferase 2) che mappa sul cromosoma 14 (14q24).

### **Nuovi approcci terapeutici**

Attualmente non esistono terapie in grado di curare o arrestare l'evoluzione delle dystroglicanopatie, nonostante i vari approcci tentati. Oggi la cura parziale dei sintomi è ancora l'unica terapia realizzabile dal punto di vista pratico (terapia sintomatica).

Tra i vari metodi sperimentati, un'interessante opzione terapeutica prevede il ripristino del complesso multimerico del distroglicano modulando l'over-espressione delle glicosiltransferasi coinvolte nella glicosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano. Per esempio l'over-espressione della putativa glicosiltransferasi Large nel modello murino Large<sup>myd</sup> permette la sintesi di  $\alpha$ -distroglicano altamente glicosilato, che migliora l'aspetto clinico del fenotipo distrofico. Anche l'over-espressione di *LARGE* in mioblasti e fibroblasti di pazienti affetti da WWS, MEB e FCMD può ripristinare la funzionalità dell' $\alpha$ -distroglicano, facilitando la connessione con i suoi ligandi. Questo effetto è specifico per *LARGE*, infatti l'over-espressione di *POMGnT1* in cellule "FCMD" non ha lo stesso esito (Barresi et al., 2004).

È stato inoltre dimostrato che *LARGE2* (*LARGE*-relative *GYLTL1B*), paralogo di *LARGE*, è in grado di stimolare l'iperglicosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano più efficacemente di *LARGE*, rendendolo quindi un potenziale candidato per nuove terapie e dimostrando l'alta flessibilità delle vie di glicosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano (Brockington et al., 2005, Fujimura et al., 2005).

I buoni risultati ottenuti tramite terapia genica su modelli animali e in vitro fanno sperare per una futura cura definitiva delle distrofie muscolari ereditarie.

## SCOPO

I lavori presenti in letteratura mostrano come il fenotipo clinico delle malattie associate alle mutazioni nei 6 geni conosciuti (*POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *fukutin*, *LARGE*, *FKRP*) coinvolti nella glicosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano sia piuttosto esteso, diversamente da quanto sospettato nel passato. Il tentativo di espandere questa conoscenza si inserisce quindi nell'ambito di un processo più ampio destinato a caratterizzare il rapporto genotipo/fenotipo nelle distrofie muscolari dei cingoli e nelle distrofie muscolari congenite. Le basi metodologiche da cui partire prevedono lo studio immunocitochimico e di immunoblot sull'ampia ed eterogenea popolazione di pazienti affetti da distrofia muscolare congenita o distrofia muscolare dei cingoli ad eziologia sconosciuta, oppure con sofferenza miopatica, selezionati dalla Banca dati delle biopsie muscolari del Centro delle Malattie Neuromuscolari di Padova (comprende oltre 8000 campioni). Questo studio permette la valutazione dell'alterazione della glicosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano e di conseguenza analizza il grado di questa alterazione, che può originare da mutazioni nei geni coinvolti nella glicosilazione. Si affianca a questo compito l'analisi di mutazione dei 6 geni sopra ricordati, volta a caratterizzare genotipicamente quei campioni risultati interessanti nel primo screening. Approfondire e espandere il rapporto genotipo/fenotipo ammette la possibilità di effettuare una precisa diagnosi molecolare in pazienti non sempre facilmente caratterizzabili e permette di offrire una consulenza genetica adeguata, e se richiesta, la diagnosi prenatale alle famiglie degli affetti. Ancora, se si rivolge lo sguardo al futuro, sarà possibile selezionare quei pazienti, in base alle loro rilevanze genetiche, cui saranno di beneficio trattamenti medici specifici e/o terapia genica.

## MATERIALI E METODI

Il gruppo di pazienti da analizzare è stato selezionato dalla Banca dati delle biopsie muscolari del Centro delle Malattie Neuromuscolari, Dipartimento di Neuroscienze, Università degli Studi di Padova, che comprende oltre 8000 campioni. I pazienti inclusi nello screening rispondono ad uno dei seguenti criteri: a) presentano distrofia muscolare congenita o distrofia muscolare dei cingoli ad eziologia sconosciuta, b) sono affetti da sofferenza miopatica con valori di CK fluttuanti, debolezza durante stati febbrili e responsività agli steroidi. Sulla base di questi criteri sono stati selezionati 234 pazienti, che possedevano normale espressione di distrofina,  $\alpha$ -sarcoglicano, calpaina, e disferlina nella biopsia muscolare.

### **Immunoistochimica**

L'immunoistochimica è stata effettuata sulle biopsie muscolari di tutti i 234 pazienti inclusi nello screening. La metodica prevede il taglio di una sezione sottile (10  $\mu$ m) al criostato della biopsia e la sua deposizione su vetrino pre-trattato (elettrostatati o gelatinati). Si incuba la sezione per tutta la notte con l'anticorpo primario (1:100) (IIH6C4 - Upstate) (Ervasti and Campbell, 1991) che riconosce un epitopo dell' $\alpha$ -dystroglicano (è diretto contro la porzione glicosilata dell' $\alpha$ -dystroglicano). L'anticorpo secondario utilizzato per visualizzare la reazione è un anticorpo anti-topo IgM coniugato con TEXAS RED (1:100) (Calbiochem). Infine si valuta il risultato al microscopio a epifluorescenza e si registrano i dati fotografici ottenuti su supporto informatico. Le immagini al microscopio sono state esaminate da almeno tre investigatori indipendenti. L'intensità della reazione viene valutata in relazione ai controlli e viene classificata come: ++, assenza di  $\alpha$ -dystroglicano, + riduzione di  $\alpha$ -dystroglicano, - normale presenza di  $\alpha$ -dystroglicano.

Inoltre durante ogni esperimento si è utilizzato sia un controllo positivo (biopsia di paziente noto con assenza di  $\alpha$ -dystroglicano) che un controllo negativo (biopsia di paziente sano).

### **Immunoblot**

L'immunoblot è stato effettuato su 94 pazienti totali, che in immunohistochimica risultavano deficitari di  $\alpha$ -dystroglicano. La procedura prevede il taglio della biopsia muscolare (circa 20/30 sezioni) al criostato e la loro solubilizzazione in tampone SDS, per ottenere una concentrazione finale di circa 40  $\mu$ g di proteine totali. I campioni sono caricati in un gel di poliacrilamide a gradiente (3.5%-12%) e separati grazie al campo elettrico. In seguito sono trasferiti su membrana di nitrocellulosa, che viene saturata tutta la notte in latte, dopo che le membrane hanno subito un trattamento dissecante all'aria. Il giorno successivo si incuba con l'anticorpo primario (1:500) (IIH6C4 - Upstate) (Ervasti and Campbell, 1991) per un'ora. Il secondario utilizzato è un anticorpo anti IgM biotinilato (Sigma-Aldrich), diluito 1:1000. La reazione è stata visualizzata con streptavidina coniugata con HRP (Amersham) (sistema avidina-biotina) e chemiluminescenza (ECL – Amersham).

### **Analisi del DNA**

Il DNA utilizzato nello screening di mutazione è stato estratto da biopsia muscolare (GenElute Mammalian Kit, SIGMA), oppure è stato ottenuto da prelievo di sangue periferico raccolto in EDTA (Miller et al, 1988) oppure è già presente nella Banca del Centro per le Malattie Neuromuscolari.

### **Analisi di mutazione dei geni *FKRP*, *LARGE*, *POMT1*, *POMT2*, *fukutin*, *POMGnT1***

Al fine di coprire l'intera regione codificante di tutti i 6 geni coinvolti nella glicosilazione dell' $\alpha$ -dystroglicano sono state disegnati i primers basandosi sull'utilizzo del programma gratuito Primer3 ([www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi)). La sequenza di riferimento per ogni gene è stata ottenuta da NCBI Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>) basandosi sui seguenti numeri di accesso a GeneBank: *POMT1*; NM\_007171.2, *POMT2*; NM\_013382.3, *POMGnT1*; NM\_017739.1, *fukutin*; NM\_006731.1, *LARGE*; NM\_133642.2 e *FKRP*; NM\_024301.3. Il gene *POMT1* contiene 20 esoni di cui 19 codificanti, il gene *POMT2* contiene 21 esoni tutti codificanti, il gene *POMGnT1* contiene 22 esoni di cui 21 codificanti, il gene *fukutin* contiene 10 esoni di cui 9 codificanti, il gene *LARGE* contiene 16 esoni di cui 14 codificanti, e infine il gene *FKRP* contiene 4 esoni di cui 1 solo codificante.

L'amplificazione dei prodotti di PCR (che include oltre alla regione codificante anche la regione confinante tra esone ed introne) è stata eseguita con il termociclatore GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem). Le reazioni erano composte da: circa 50 ng di DNA genomico, 0.25 mM di dNTPs, 0.2  $\mu$ M di ciascun primers, unità di Taq DNA polimerasi (GOLD Taq, Applied Biosystem), e il magnesio cloruro 25 mM (Applied Biosystem).

Le condizioni di amplificazione sono: 10 minuti a 95°C, 35 cicli di; 30 secondi a 94°C, 30 secondi a 60°C, 30 secondi a 72°C, e estensione finale di 10 minuti a 72°C. Naturalmente la temperatura di appaiamento di alcune coppie di primers differiva dai 60°C standard utilizzati, cosicché si è trovata una temperatura di appaiamento migliore. Gli amplificati sono stati controllati in gel d'agarosio e successivamente analizzati con la tecnica SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) (Orita, M., et al. Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel Electrophoresis as SSCPs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 1989, (86): 2766-70). Questa tecnica permette di valutare il tasso di migrazione del DNA in un gel non-denaturante di poliacrilamide, paragonando il campione di interesse con un DNA di controllo (Sunnucks et al., 2000). La procedura riesce a separare i diversi frammenti a singola elica di [DNA](#) in base alla loro diversa mobilità elettroforetica, mobilità dovuta ad una differente conformazione

assunta nel gel e conseguentemente alla loro diversa sequenza nucleotidica (Wagner John, Accessed 2003 February 17). La metodica prevede la preparazione di un gel di poliacrilamide allestito in una ampia struttura di vetro. I campioni vengono denaturati a 95°C e rapidamente raffreddati in ghiaccio, successivamente sono caricati nel gel. La corsa dura in genere 4 ore, a cui segue la colorazione del gel con nitrato d'argento e lo sviluppo in soluzione basica con formaldeide. Infine i risultati sono valutati visivamente e conservati su supporto informatico con l'acquisizione del bandeggio caratteristico tramite scanner.

I conformers evidenziati con SSCP sono stati riamplicati usando gli stessi set di primers originari e poi purificati (purification kit GE Healthcare) e portati al servizio di sequenziamento del CRIBI-BMR Genomics (Via Redipuglia 22, 35131 Padova). Infine i files con i risultati del sequenziamento sono analizzati con il programma Seqman II (Pacchetto sequenze DNASTAR), paragonando la sequenza di interesse con la sequenza di riferimento.

### **Conferma delle mutazioni**

Se è stata trovata una variazione nei risultati del sequenziamento, si deve procedere per gradi:

- a) si controlla la presenza in letteratura della variazione. Può trattarsi di un polimorfismo noto, di una mutazione silente, o di una mutazione già riportata. Nel primo caso si fa riferimento al database on-line Entrez - SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), nel secondo caso si controlla la sequenza aminoacidica della proteina in esame e nell'ultimo caso si riporta il dato di letteratura, facendo riferimento a The Human Gene Mutation Database (HGMD®) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), Leiden Muscular Dystrophy pages© LOVD (<http://www.dmd.nl/>) oppure direttamente agli articoli pubblicati;
- b) se la variazione non è presente in letteratura occorre validare questa nuova possibile mutazione. Si rende necessario confermare il dato con una seconda metodica indipendente. Si procede quindi all'analisi dei polimorfismi dei frammenti di restrizione. Questo metodo

consiste nel digerire con un adeguato enzima di restrizione il prodotto di PCR di interesse. Successivamente si analizza il risultato su gel d'agarosio e si conserva il risultato con fotografia Polaroid. Al fine di determinare la frequenza della nuova mutazione si testa la digestione dell'amplificato di interesse su di un gruppo di almeno 50 pazienti sani (100 cromosomi di controllo). Se la variazione nucleotidica in esame è presente in 1 o più cromosomi di controllo viene definita come polimorfismo, diversamente si tratta di mutazione. Il metodo descritto è il più utilizzato, ma non sempre è applicabile a causa della possibile mancanza di acquisizione o perdita di un sito di restrizione. Si può alternativamente utilizzare la tecnica tetra-primers ARMS PCR che è basata sull'allestimento di 2 reazioni di amplificazione con 4 primers specifici, una coppia dei quali ha all'estremità 3' terminale una base normale e l'altro la mutata. Se si ottiene un prodotto sia con il primer normale che con il primer mutato, si rileva la presenza di una variazione in eterozigosi, se invece l'amplificazione avviene solo con uno dei 2 primers, o ci si riferisce ad una variazione in omozigosi oppure all'assenza della variazione di interesse (Ye et al., 2001)

### **Classificazione clinica dei pazienti**

I 234 pazienti analizzati sono clinicamente suddivisi in: 146 pazienti con distrofia muscolare dei cingoli (LGMD), 38 pazienti con distrofia muscolare congenita (CMD) e 50 pazienti con elevato valore di CK il cui fenotipo clinico suggeriva una  $\alpha$ -dystroglicanopatia.

## RISULTATI

### Caratterizzazione clinica dei pazienti

Il gruppo di pazienti selezionato dalla Banca dati delle biopsie muscolari del Centro delle Malattie Neuromuscolari, è composto da 234 campioni. Di questi 234, 146 pazienti sono affetti da LGMD, 38 da CMD e 50 da miopatia con fenotipo mite. In totale sono risultati deficitari di  $\alpha$ -distroglicano 94 pazienti così suddivisi: 57 presentano distrofia dei cingoli (LGMD), 19 distrofia muscolare congenita (CMD) e 18 miopatia con fenotipo mite.

### Studio immunoistochimico

Questo studio è stato condotto su 234 biopsie muscolari, testate con l'anticorpo I1H6C4 (Upstate Technology) per valutare il deficit relativo alla glicoproteina  $\alpha$ -distroglicano. Ben 94 campioni, cioè il 40% (94/234) dei pazienti analizzati, viene riconosciuto come deficitario di  $\alpha$ -distroglicano. In particolar modo il 34% (79/234) presenta deficit parziale di  $\alpha$ -distroglicano, mentre il 6% (15/234) mostra una totale assenza di  $\alpha$ -distroglicano. Nella foto IHC1 viene visualizzato il pattern reattivo di un controllo, nella foto IHC2 e IHC3 il pattern di 2 pazienti con deficit parziale di  $\alpha$ -distroglicano e nella foto IHC4 un paziente con deficit totale.

Per quanto concerne il fenotipo clinico correlato a questi risultati, si evince che il 39% (57/146) dei pazienti deficitari è affetto da LGMD, il 50% (19/38) dei pazienti deficitari è affetto da CMD e il 56% (18/32) dei pazienti deficitari è affetto da miopatia con fenotipo mite (tabella 1).

	Normale	Deficit parziale	Deficit totale	<b>TOT</b>
LGMD	89	48	9	<b>146</b>
CMD	19	13	6	<b>38</b>

miopatia	32	18	0	<b>50</b>
<b>TOT</b>	<b>140</b>	<b>79</b>	<b>15</b>	<b>234</b>

Tabella 1. Relazione tra la reattività dell'anticorpo I1H6C4 verso l' $\alpha$ -distroglicano e il fenotipo clinico dei pazienti.

### **Studio di immunoblot**

L'immunoblot è stato eseguito sui 94 campioni risultati deficitari di  $\alpha$ -distroglicano in immunoistochimica. L'analisi ha evidenziato la fedele corrispondenza tra i dati di immunoistochimica e di immunoblot. Infatti sia i pazienti parzialmente deficitari per l' $\alpha$ -distroglicano che i pazienti con assenza di  $\alpha$ -distroglicano rispecchiano questo valore anche su nitrocellulosa. Grazie all'anticorpo I1H6C4 diretto contro la porzione glicosilata dell' $\alpha$ -distroglicano, è risultato che 79 pazienti erano parzialmente deficitari per la proteina in esame, mentre 15 apparivano come totalmente deficitari. Come si può notare dalla foto esemplificativa WB alcuni pazienti (n°1, 3, 5) hanno un bandeggio che riflette quello evidenziato nei controlli, altri invece (n°6, 7) hanno una diminuzione netta dell' $\alpha$ -distroglicano e altri ancora (n°2, 4, 8) possiedono una mancanza totale del pattern caratteristico dell' $\alpha$ -distroglicano.

### **Studio di mutazione**

Lo screening di mutazione è stato svolto su 6 geni: *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *fukutin*, *LARGE*, *FKRP*. Senza lo studio dell'RNA e l'analisi biochimica funzionale non è possibile determinare la patogenicità delle nuove mutazioni scoperte nei 6 geni, soprattutto in relazione alle nuove variazioni missenso ritrovate. È comunque possibile discriminare se queste variazioni nucleotidiche siano rari polimorfismi o possibili mutazioni basandosi sull'analisi dei frammenti di restrizione, testando la mutazione su almeno 100 cromosomi di controllo. Sono invece state considerate patogenetiche le

mutazioni nonsense, le inserzioni, le alterazioni dei siti di splicing, nonché le mutazioni già classificate in letteratura. Le variazioni nucleotidiche considerate come polimorfismi, sia esoniche che introniche, erano presenti nei database SNP (Single Nucleotide Polymorphism, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) e Leiden Open Variation Database (LOVD, <http://www.dnd.nl>). Di conseguenza anche le sostituzioni aminoacidiche sono state valutate come patogenetiche se in relazione ad un'altra mutazione evidente o se i cambiamenti ipotetici comportavano sostituzioni aminoacidiche in regioni altamente conservate. Di alcuni pazienti è stata scoperta solo una singola alterazione, di cui non è stata determinata la eventuale patogenicità.

I pazienti analizzati sono stati 94, ed in questi sono state identificate 26 mutazioni patogenetiche totali (26 pazienti appartenenti a 26 famiglie diverse). Il 73% (19/26) dei pazienti risultava possedere un pattern immunoistochimico e di immunoblot con parziale deficit di  $\alpha$ -dystroglicano, mentre il 27% (7/26) dei pazienti evidenziava un deficit totale di  $\alpha$ -dystroglicano. Il dato finale che si ricava esprime un tasso di mutazione pari al 28% (26 pazienti mutati su 94 pazienti), che suddiviso tra i vari fenotipi clinici diventa: pazienti affetti da LGMD 28% (16/57), pazienti affetti da CMD 26% (5/19) e pazienti affetti da miopatia con fenotipo mite 28% (5/18). In quest'ultimo gruppo, tutti i pazienti presentano mutazioni nel gene *FKRP*.

Se invece si esamina il tasso di mutazione all'interno del gruppo di pazienti parzialmente deficitari si evince una cifra pari al 24% (19/79), diversa da quella del gruppo di pazienti totalmente deficitari, pari al 46% (7/15).

I tipi di mutazione scoperti sono stati: 25 mutazioni missenso, 2 mutazioni nonsense, 2 inserzioni, 2 mutazioni nel sito di splicing. Nel gene *FKRP* è presente 8 volte la mutazione ricorrente C826A (Leu276Ile) sia in omozigosi (in 7 pazienti) che in eterozigosi (1 unico paziente, associata a C1384T).

Sono state scoperte 6 mutazioni non presenti in letteratura, di cui 5 nel gene *POMT1*. Queste sono:

a) 280+1G>T, mutazione in omozigosi nel sito donatore di splicing di cui non è stato possibile valutare l'effettiva patogenicità a causa della mancanza di sufficiente materiale bioptico;

b) C1864T, (R622X) mutazione non-senso in eterozigosi che causa un prematuro codone di stop;

c) A430G, (Asn144Asp) mutazione missenso in eterozigosi testata su oltre 100 cromosomi di controllo;

d) C1241T, (Thr414Met) mutazione missenso in eterozigosi testata su oltre 100 cromosomi di controllo;

e) C1545T, (Tyr515X) mutazione non-senso in eterozigosi che causa un prematuro codone di stop.

Nel gene *POMT2* è stata trovata una sola mutazione nuova C1300T (Arg434Trp), mutazione missenso in eterozigosi testata su oltre 100 cromosomi di controllo.

Nei geni *LARGE*, *fukutin*, *POMGnT1* non si evidenziano variazioni nucleotidiche patogenetiche.

### **Correlazione genotipo-fenotipo**

È importante sottolineare come sia presente una certa connessione tra il fenotipo clinico e il pattern caratteristico di mancanza di glicosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano osservato in immunistochemica e in immunoblot. Infatti ad un deficit totale di glicosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano si associa una maggiore severità sintomatologia nella distrofia, rispetto ad un deficit parziale. Diversamente, il fenotipo clinico dei pazienti, che presentavano mutazioni in uno dei 6 geni coinvolti, non era diverso da quei pazienti in cui non è stata trovata alcuna mutazione. Ciò sta ad indicare come lo spettro fenotipico dei pazienti sia significativamente più ampio di quanto sospettato inizialmente e non sia in diretta correlazione con il genotipo sottostante.

## DISCUSSIONE

Grazie agli studi compiuti negli ultimi anni, è diventato sempre più evidente che perturbazioni nella glicosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano danno origine a differenti distrofie muscolari. Il ruolo centrale dell' $\alpha$ -distroglicano nella patogenesi di queste malattie sottolinea la sua posizione cruciale nel distroglicano. Quest'ultimo è una struttura indispensabile di connessione, coordinazione e stabilizzazione fra gli elementi del citoscheletro e la matrice extracellulare. L' $\alpha$ -distroglicano è una proteina periferica di membrana, legata ad altre molecole, che risulta altamente glicosilata. Alterazioni di glicosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano originano un gruppo di distrofie muscolari autosomiche recessive, come le distrofie muscolari dei cingoli e le distrofie muscolari congenite, definite complessivamente come distroglicanopatie. Le distroglicanopatie presentano forte eterogeneità fenotipica: si passa dalle forme più severe ad esordio congenito come Walker-Warburg Syndrome (WWS), Muscle-Eye-Brain (MEB), Fukuyama Congenital Muscular Dystrophy (FCMD), Congenital Muscular Dystrophy type 1C (MDC1C), a forme più lievi come Limb-Girdle Muscular Dystrophy (LGMD). Geneticamente, le distroglicanopatie sono causate da mutazioni in almeno 6 geni fino ad oggi conosciuti: *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *fukutin*, *LARGE*, *FKRP*. Tutti codificano per glicosiltransferasi putative o accertate.

Nel gruppo di pazienti mutati si è evidenziata una ridotta glicosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano assai variabile, che non modifica però l'espressione delle proteine della matrice extracellulare, quali la laminina  $\alpha 2$ , il perlecano, e il collagene IV o le proteine di membrana, quali l' $\alpha$ -sarcoglicano o la distrofina, poiché l'analisi di routine effettuata presso il laboratorio del Centro delle Malattie Neuromuscolari non ha evidenziato variazioni significative per gli anticorpi diretti verso queste molecole. La ridotta glicosilazione evidenziata in immunoblot e immunoistochimica nei 94 pazienti

sembra mettere in correlazione la severità fenotipica con la quantità di epitopo di  $\alpha$ -distroglicano glicosilato.

Non sempre è stato possibile determinare il secondo allele mutato all'interno della casistica di pazienti, e ciò può essere imputabile alla sensibilità della metodica di analisi impiegata, che non è del 100%, oppure al fatto che le regioni non codificanti dei geni (come zone promotore o intere regioni introniche, escludendo le regioni fiancheggianti gli esoni) non sono state analizzate. La relativa sensibilità della metodica può eventualmente rendere ragione del fatto che la percentuale di mutati trovati non sia come l'atteso, che dai dati di letteratura si aggirerebbe sul 33%. Il tasso di mutazione trovato tra i pazienti che presentavano assenza di glicosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano (totalmente deficitari) è risultato più alto di quelli che presentavano parziale glicosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano (deficit parziale). Mentre nel primo caso il valore è di circa il 46% (7/15), nel secondo caso del 24% (19/79)

Il fatto che dall'analisi di mutazione dei 6 geni siano risultati mutati il 26% dei pazienti, indica una frequenza compatibile con i dati di letteratura. Infatti il gruppo di Muntoni (Godfrey et al., 2007) ha evidenziato una frequenza di mutazione pari al 34%, con 92 pazienti analizzati, contro i 94 pazienti del presente lavoro. Il loro studio non è completamente sovrapponibile al nostro, poiché nell'analisi non ammettono tutti quei pazienti risultati positivi allo screening di mutazione nel gene *FKRP*, valutando esclusivamente *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *fukutin*, *LARGE*. Ciononostante questo lavoro rappresenta un buon punto di riferimento per la valutazione della frequenza di mutazione all'interno delle distroglicanopatie, poiché attualmente nessun altro gruppo è in grado di fornire un dato statistico simile.

Se si considera inoltre le mutazioni nel gene per *FKRP*, si può osservare come siano presenti nel 59% dei pazienti mutati, e sono tutte distribuite nella porzione codificante del gene per la *FKRP*, non interessando alcuno dei domini funzionali identificati, fondamentali per l'attività enzimatica, quali il dominio transmembrana e il motivo DxD (Esapa et al., 2002; Esapa et al., 2005, Boito et al.,

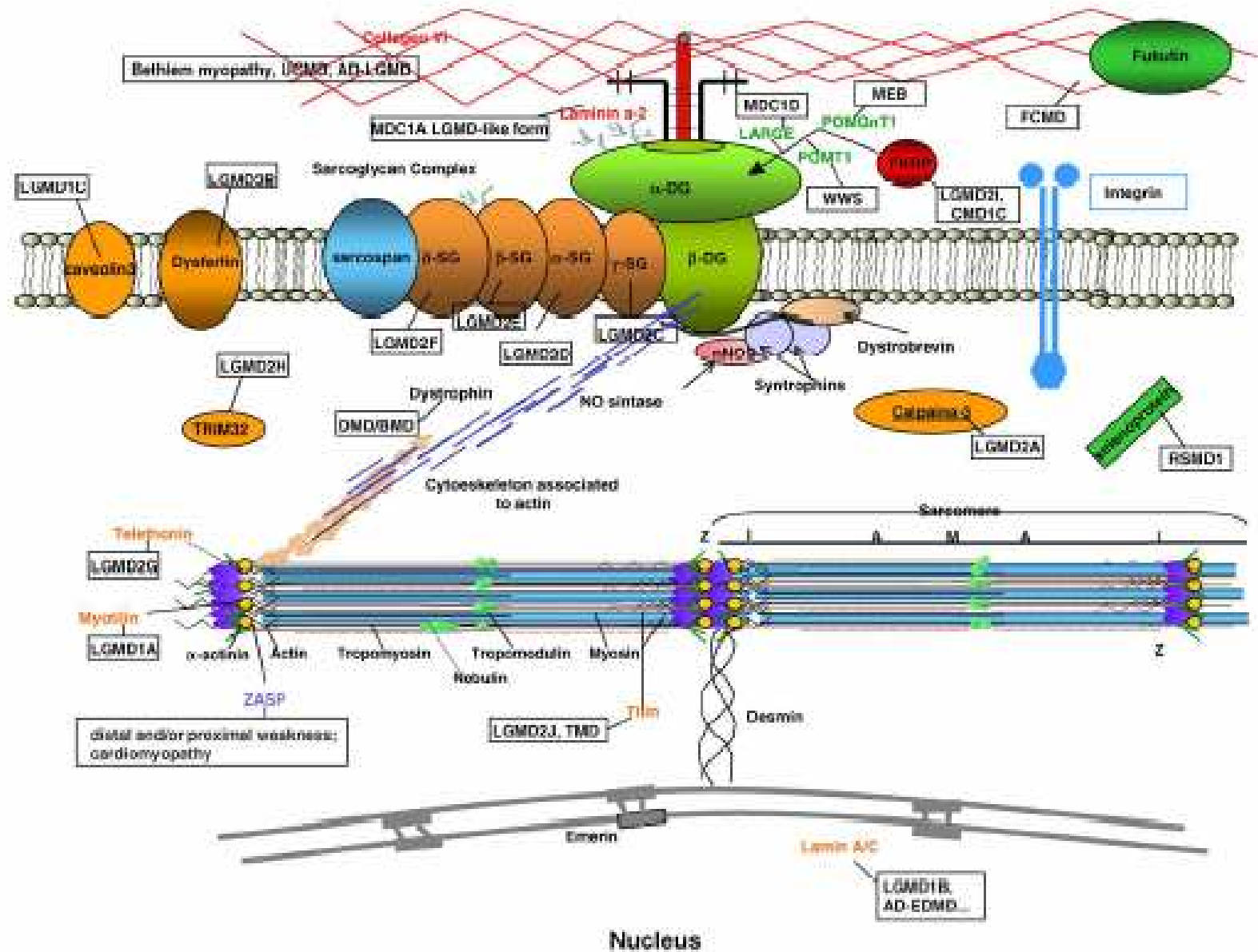
2005). Tuttavia l'analisi della frequenza delle singole mutazioni mostra che la mutazione Leu276Ile (C826A) è presente nel 47% degli alleli mutati nei pazienti affetti da mutazioni in *FKRP*, mentre in totale questa percentuale scende al 28%. Si può ipotizzare che questa elevata frequenza sia dovuta ad un hotspot mutazionale, ossia la citosina 826 si colloca in una regione ad elevata frequenza di mutazione, come suggerito dal fatto che questa mutazione sia stata identificata in gruppi etnici diversi con differente background genetico (Brockington et al., 2001; Mercuri et al., 2003, Walter et al., 2004). Tutte le mutazioni rilevate nel gene *FKRP* sono di tipo missenso, dato che sembra suggerire come le mutazioni associate a completa perdita di funzione della FKRP siano incompatibili con la vita (quindi mutazioni nonsense, mutazioni frame-shift, inserzioni/delezioni), e vengano selezionate precocemente durante lo sviluppo embrionale. Inoltre è interessante notare come le mutazioni che generano un fenotipo più severo, quali WWS o CMD1C o MEB, si localizzino nella porzione C-terminale della membrana, vicino al motivo DxD, mentre i fenotipi più lievi LGMD siano causati da mutazioni più prossime alla regione N-terminale.

Per quanto concerne le mutazioni nel gene *POMT1*, non si sono trovate mutazioni ricorrenti, e anzi le mutazioni presenti appartengono a diverse tipologie funzionali, come mutazioni missenso, nonsense, inserzioni, e mutazioni nel sito di splicing, benché non tutte nella porzione codificante del gene. Questa eterogenicità genetica rispecchia l'ampio spettro fenotipico osservato nei pazienti con mutazioni appartenenti a questo gene, che vanno da forme severe di distrofia muscolare congenita (come WWS) a forme meno aggressive come la distrofia muscolare dei cingoli di tipo 2K. L'ipotesi quindi di correlare direttamente il genotipo con un fenotipo peculiare non sembra essere sostenibile.

Per quanto concerne la scoperta di mutazioni nuove, il presente lavoro riporta 6 nuove mutazioni (5 nel gene *POMT1* e 1 nel gene *POMT2*) espandendo ulteriormente il fenotipo clinico associato a queste mutazioni.

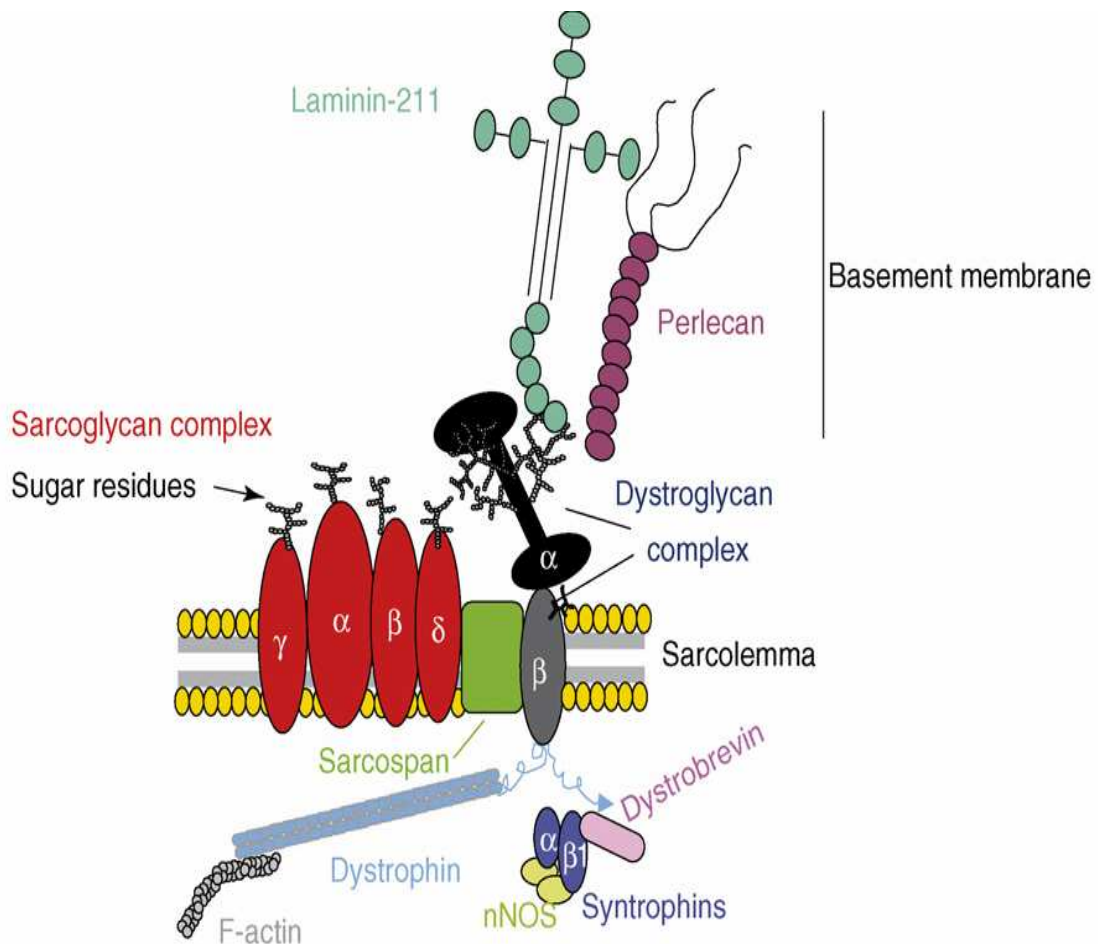
Questo lavoro inoltre suggerisce che altri geni possono essere imputabili nella patogenesi delle distroglicanopatie. L'identificazione di nuovi geni darà maggiore impulso alla ricerca nel campo

delle distrofie muscolari e fornirà maggiori informazioni sul processo di glicosilazione dell' $\alpha$ -dystroglicano.



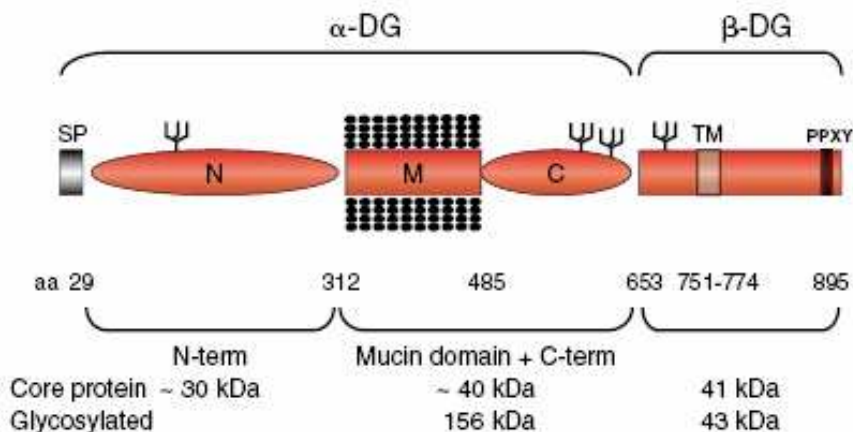
55  
M. Guglieri et al. / Clinica Chimica Acta 361 (2005) 54–79

**FIGURA n°1.** Schema delle localizzazioni delle proteine coinvolte in distrofie muscolari dei cingoli e distrofie muscolari congenite (Guglieri et a.l, 2005)



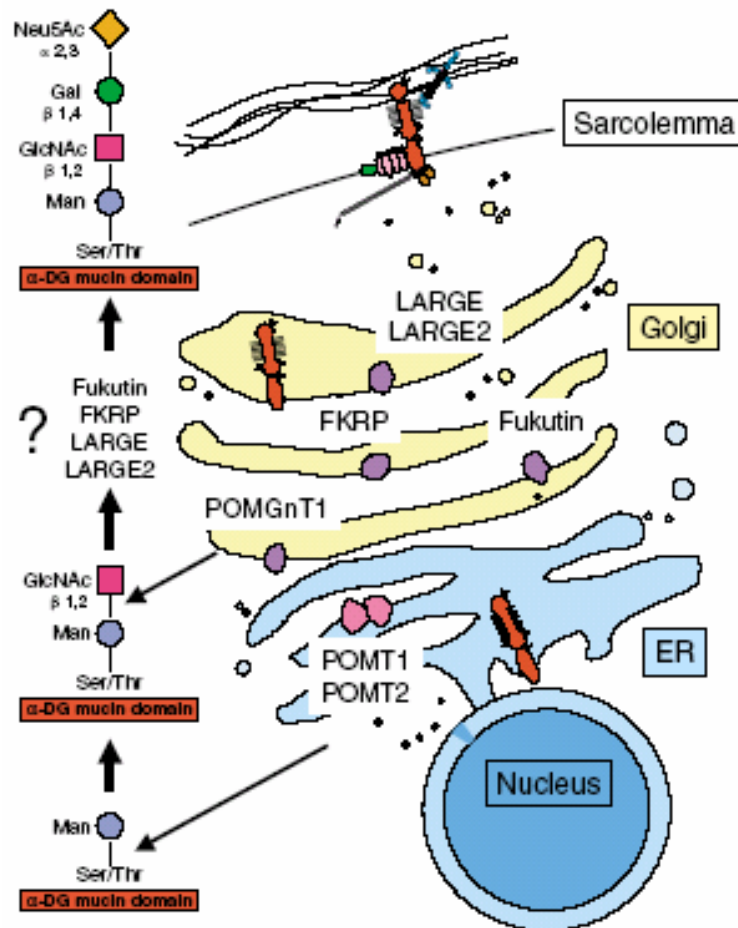
TRENDS in Biotechnoloav

**FIGURA n°2. Complesso multimerico DGC (dystrophin-associated glycoprotein complex)** Al centro è visibile il complesso del distroglicano ( $\alpha$  e  $\beta$  distroglicano) (Sciandra et al., 2007)



**FIGURA n°3. Organizzazione dei domini del distroglicano.**

I cerchi in nero indicano i residui glucidici O-linked, mentre le ramificazioni indicano le catene glucidiche N-linked. SP=peptide segnale, TM=dominio transmembrana, PPXY, sito di legame per la distrofina. I pesi molecolari indicati in basso si riferiscono all'assenza e presenza di glicosilazione post-traduzionale (Barresi et al., 2005)



**FIGURA n°4. Glicosilazione dell' $\alpha$ -dystroglicano.** Sono indicate le localizzazioni delle glicosiltransferasi coinvolte nella *O*-glicosilazione dell' $\alpha$ -dystroglicano all'interno della cellula. (Barresi et al., 2005)

**Foto IHC: studio di immunoistochimica dell' $\alpha$ -dystroglicano in alcuni pazienti rappresentativi.**

Sezioni di biopsia muscolare marcati con anticorpo I1H6C4 contro l'epitopo glicosilato dell' $\alpha$ -dystroglicano, proteina che presenta una colorazione normale nel controllo IHC1, una totale assenza in IHC4 e una parziale riduzione in IHC2 e IHC3.

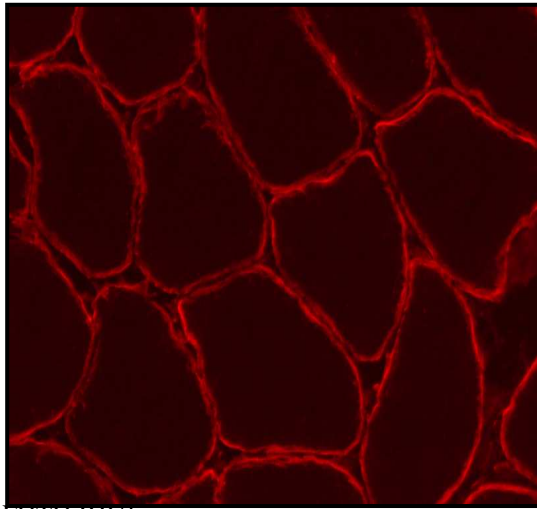


FOTO IHC1

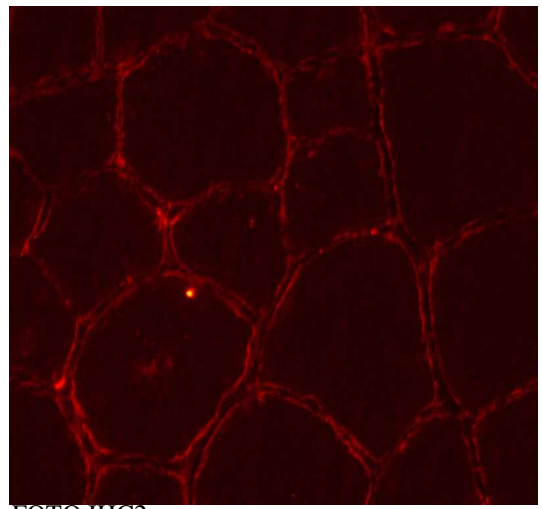


FOTO IHC2

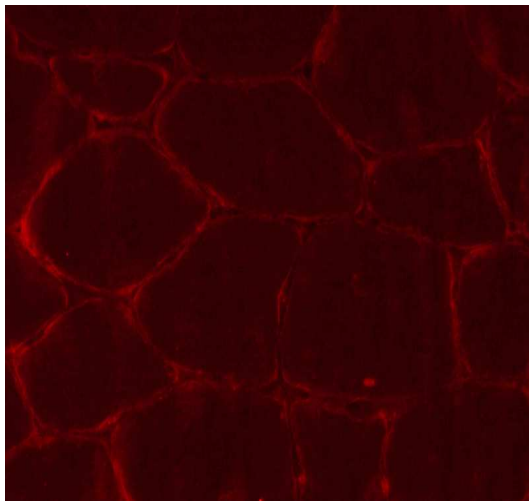


FOTO IHC3

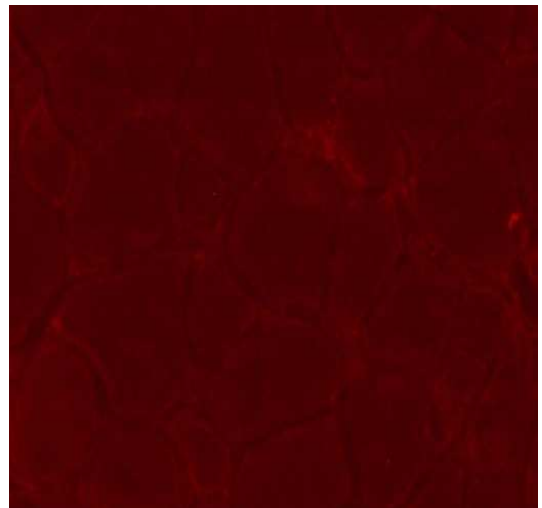
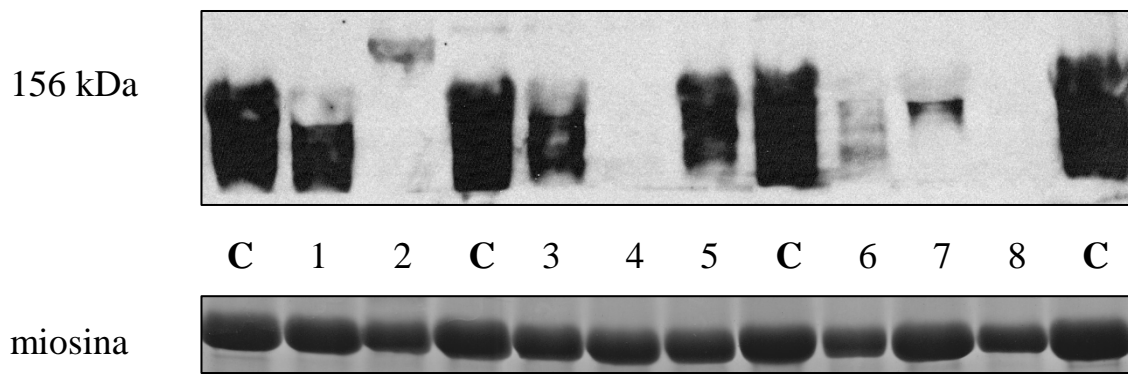


FOTO IHC4

**FOTO WB: studio di immunoblot dell' $\alpha$ -dystroglicano in alcuni pazienti rappresentativi.**

Il pannello superiore indica l'analisi di immunoblot utilizzando l'anticorpo IIH6C4 contro l'epitopo glicosilato dell' $\alpha$ -dystroglicano. Nel pannello inferiore il gel colorato, dopo trasferimento, con Coomassie Blue visualizza la catena pesante della miosina utilizzata per normalizzare la quantità di proteine caricate.



## BIBLIOGRAFIA

Adams RD, Victor M., Principi di Neurologia, McGraw-Hill, 2006.

Angelini C, Fanin M, Menegazzo E, Freda MP, Duggan DJ, Hoffman EP. Homozygous alpha-sarcoglycan mutation in two siblings: one asymptomatic and one steroid responsive mild limb-girdle muscular dystrophy patient. *Muscle Nerve*, 1998; 21:769-775;

Aravind L, Koonin EV. The fukutin protein family--predicted enzymes modifying cell-surface molecules. *Curr Biol*, 1999; 9:R836-7;

Balci B, Uyanik G, Dincer P, Gross C, Willer T, Talim B, Haliloglu G, Kale G, Hehr U, Winkler J Topaloglu H. An autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2) with mild mental retardation is allelic to Walker-Warburg syndrome (WWS) caused by a mutation in the POMT1 gene. *Neuromuscul Disord*, 2005; 15:271-275;

Banker BQ, Victor M, Adams RD. Arthrogryposis multiplex due to congenital muscular dystrophy. *Brain*. 1957 Sep;80(3):319-34.

Banks GB, Fuhrer C, Adams ME, Froehner SC. The postsynaptic submembrane machinery at the neuromuscular junction: requirement for rapsyn and the utrophin/dystrophin-associated complex. *J Neurocytol*. 2003 Jun-Sep;32(5-8):709-26.

Bansal D, Campbell KP. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Bio Trends Cell Biol*, 2004; 14:206-13;

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 K. LARGE can functionally bypass alpha-dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. *Nat Med*, 2004; 10:696-703;

Barresi R, Campbell KP. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci*, 2005; 119:199-207;

Bashir R, Strachan T, Keers S, Stephenson A, Mahjneh I, Marconi G, Nashef L, Bushby KM. A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p. *Hum Mol Genet*, 1994; 3:455-7;

Blake DJ. Dystrobrevin dynamics in muscle-cell signalling: a possible target for therapeutic intervention in Duchenne muscular dystrophy? *Neuromuscul Disord*. 2002 Oct;12 Suppl 1:S110-7.

Boito CA, Melacini P, Vianello A, Prandini P, Gavassini BF, Bagattin A, Siciliano G, Angelini C, Pegoraro E. Clinical and molecular characterization in limb girdle muscular dystrophy 2I patients. *Arch Neurol*, 2005; 62:1894-1899;

Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizberea JA, Duboc D, Fardeau M, Toniolo D, Schwartz K. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*, 1999; 21:285-8;

Bonnemann CG, Modi R, Noguchi S, Mizuno Y, Yoshida M, Gussoni E, McNally EM, Duggan DJ, Angelini C, Hoffman EP.  $\beta$ -sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet*, 1995; 11:266- 73;

Bozzi M, Veglia G, Paci M, Sciandra F, Giardina B, Brancaccio A. A synthetic peptide corresponding to the 550-585 region of alpha-dystroglycan binds beta-dystroglycan as revealed by NMR spectroscopy. *FEBS Lett*. 2001 Jun 22;499(3):210-4.

Brockington M, Blake DJ, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, Ponting CP, Estournet B, Romero NB, Mercuri E, Voit T, Sewry CA, Guicheney P, Muntoni F. Mutations in the fukutin-related protein (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet*, 2001a; 69:1198-1209;

Brockington M, Yuva Y, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, Herrmann R, Anderson LV, Bashir R, Burgunder JM, Fallet S, Romero N, Fardeau M, Straub V, Storey G, Pollitt C, Richard I, Sewry CA; Bushby K, Voit T, Blake DJ, Muntoni F. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet*, 2001b; 10:2851-2859;

Bushby KM, Beckmann JS. The limb-girdle muscular dystrophy. Proposal for a new nomenclature. *Neuromusc Disord*, 1995; 5:337-343;

Bushby KM. Towards the classification of the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromusc Disord*, 1996; 6: 439-441;

Bushby KM. The limb-girdle muscular dystrophies-multiple genes, multiple mechanisms. *Hum Mol Genet*, 1999b; 8:1875-82;

Bushby KM. Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain*, 1999a.; 122:1403-20;

Crosbie RH, Heighway J, Venzke DP, Lee JC, Campbell KP. Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem*. 1997 Dec 12;272(50):31221-4

de Bernabé DB, van Bokhoven H, van Beusekom E, Van den Akker W, Kant S, Dobyns WB, Cormand B, Currier S, Hamel B, Talim B, Topaloglu H, Brunner HG. A homozygous nonsense mutation in the fukutin gene causes a Walker-Warburg syndrome phenotype. *J Med Genet*. 2003 Nov;40(11):845-8.

de Paula F, Vieira N, Starling A, Yamamoto LU, Lima B, de Cassia Pavanello R, Vainzof M, Nigro V, Zatz M. Asymptomatic carrier for homozygous novel mutations in the FKRPs gene: the other end of the spectrum. *Europ J Hum Genet*, 2003; 11:923-930;

Dolatshad NF, Brockington M, Torelli S, Skordis L, Wever U, Wells DJ, Muntoni F, Brown SC. Mutated fukutin-related protein (FKRP) localises as wild type in differentiated muscle cells. *Exp Cell Res*, 2005; 309:370-8;

Driss A, Amouri R, Ben Hamida C, Souilem S, Gouider-Khouja N, Ben Hamida M, Hentati F. A new locus for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in a large consanguineous Tunisian family maps to chromosome 19q13.3. *Neuromusc Disord*, 2000; 10:240-246;

Duggan DJ, Gorospe JR, Fanin M, Eric P Hoffman, Angelini C, Pegoraro E, McNally E, Bonneman CG, Kunkel LM, Noguchi S, Ozawa E, Pendlenbury W, Oechler H, Waclawik A, Duenas DA, Hutchison T, Hausmanowa-Petrusewicz I, Fidzianska A, Bean SC, Haller JS, Bodensteiner J, Greco C, Pestronk A, Berardinelli A, Gelinas DF, Abram H, Kuncl RW. Mutations in the sarcoglycan genes in patients with myopathy. *N Eng J Med*, 1997; 336:618-624;

Engel J.. Laminins and other strange proteins. *Biochemistry*, 1992; 31:10643-51;

Ervasti JM and Campbell KP. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol*, 1993; 122:809-823;

Ervasti, J. M. and Campbell, K. P. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*, 1991; 66:1121-1131;

Esapa CT, Benson MA, Schroder JE, Martin-Rendon E, Brockington M, Brown SC, Muntoni F, Kroger S, Blake DJ. Functional requirements for fukutin-related protein in the Golgi apparatus. *Hum Mol Genet*, 2002; 11:3319-31;

Esapa CT, McIlhinney RA, Blake DJ. Fukutin-related protein mutations that cause congenital muscular dystrophy result in ER-retention of the mutant protein in cultured cells. *Hum Mol Genet*, 2005; 14:295-305;

Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, Angelini C. The frequency of limb girdle muscular dystrophy 2A in northeastern Italy. *Neuromuscul Disord*, 2005; 15:218-24;

Feit H, Silbergleit A, Schneider LB, Gutierrez JA, Fitoussi RP, Reyes C, Rouleau GA, Brais B, Jackson CE, Beckmann JS, Seboun E. Vocal cord and pharyngeal weakness with autosomal dominant distal myopathy: clinical description and gene localization to 5q31 Am J Hum Genet, 1998; 63:1732-42;

Frosk P, Weiler T, Nylén E, Sudha T, Greenberg CR, Morgan K, Fujiwara TM, Wrogemann K. Limb-girdle muscular dystrophy type 2H associated with mutation in TRIM32, a putative E3-ubiquitin-liagase gene. Am J Hum Genet, 2002; 70:663-672;

Galbiati F, Razani B, Lisanti MP .Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy. Trends Mol Med, 2001; 7:435-41;

Godfrey C, Clement E, Mein R, Brockington M, Smith J, Talim B, Straub V, Robb S, Quinlivan R, Feng L, Jimenez-Mallebrera C, Mercuri E, Manzur AY, Kinali M, Torelli S, Brown SC, Sewry CA, Bushby K, Topaloglu H, North K, Abbs S, Muntoni F. Refining genotype-phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. Brain. 2007 Oct;130(Pt 10): 2725-35;

Guglieri M, Magri F, Comi GP. Molecular etiopathogenesis of limb girdle muscular and congenital muscular dystrophies: boundaries and contiguities. Clin Chim Acta, 2005; 361:54-79;

Hackman P, Vihola A, Haravuori H, Marchand S, Sarparanta J, De Seze J, Labeit S, Witt C, Peltonen L, Richard I, Udd B. Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in TTN, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin. Am J Hum Genet, 2002; 7:492-500;

Haravuori H, Makela-Bengs P, Udd B, Partanen J, Pulkkinen L, Somer H, Peltonen L. Assignment of the tibial muscular dystrophy locus to chromosome 2q31. *Am J Hum Genet*, 1998; 62:620-6;

Hauser MA, Horrigan SK, Salmikangas P, Torian UM, Viles KD, Dancel R, Tim RW, Taivainen A, Bartoloni L, Gilchrist JM, Stajich JM, Gaskell PC, Gilbert JR, Vance JM, Pericak-Vance MA, Carpen O, Westbrook CA, Speer MC. *Hum Mol Genet*, 2000; 9:2141-7;

Hayashi YK. Membrane-repair machinery and muscular dystrophy. *Lancet*. 2003 Sep 13;362(9387):843-4.

Henry MD, Campbell KP. Dystroglycan inside and out. *Curr Opin Cell Biol*. 1999 Oct;11(5):602-7.

Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 1987; 51(6):919-28;

Holt KH, Crosbie RH, Venzke DP, Campbell KP. Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide. *FEBS Lett*, 2000; 468:79-83;

Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J. M., Leveille, C. J., Slaughter, C. A., Sernett, S. W. and Campbell, K. P. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, 1992; 355:696-702;

Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Milatovich, A., Ozcelik, T., Yang, B., Koepnick, K., Francke, U. and Campbell, K. P. Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum Mol Genet*, 1993; 2:1651-1657;

James M, Nuttall A, Ilesley JL, Ottersbach K, Tinsley JM, Sudol M, Winder SJ. Adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of (beta)-dystroglycan regulates its interaction with utrophin. *J Cell Sci.* 2000 May;113 ( Pt 10):1717-26;

Jurado LA, Coloma A, Cruces J. Identification of a human homolog of the *Drosophila* rotated abdomen gene (POMT1) encoding a putative protein O-mannosyl-transferase, and assignment to human chromosome 9q34.1. *Genomics*, 1999; 58:171-80;

Kanagawa M, Michele DE, Satz JS, Barresi R, Kusano H, Sasaki T, Timpl R, Henry MD, Campbell K. Disruption of perlecan binding and matrix assembly by post-translational or genetic disruption of dystroglycan function. *FEBS Lett*, 2005; 579:4792-6P;

Kanagawa M, Saito F, Kunz S, Yoshida-Moriguchi T, Barresi R, Kobayashi YM, Muschler J, Dumanski JP, Michele DE, Oldstone MB. Molecular recognition by LARGE is essential for expression of functional dystroglycan. *Cell*, 2004; 117:953-964;

Kawabe K, Goto K, Nishino I, Angelini C, Hayashi YK. Dysferlin mutation analysis in a group of Italian patients with limb-girdle muscular dystrophy and Miyoshi myopathy. *Eur J Neurol*, 2004; 11:657-61;

Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-Iida E, Nomura Y, Segawa M, Yoshioka M, Saito K, Osawa M, Hamano K, Sakakihara Y, Nonaka I, Nakagome Y, Kanazawa I, Nakamura Y, Tokunaga K, Toda T. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature*, 1998; 394:388-92;

Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*. 1991 May 3;252(5006):668-74;

Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res*. 2004;94:1023-31;

Leschziner, A., Moukhles, H., Lindenbaum, M., Gee, S. H., Butterworth, J., Campbell, K. P. and Carbonetto, S. Neural regulation of alpha-dystroglycan biosynthesis and glycosylation in skeletal muscle. *J. Neurochem*, 2000; 74:70-80;

Liu CY, Kaufman RJ. The unfolded protein response. *J Cell Sci*, 2003; 116:1861-2;

Liu J, Aoki M, Illa I, Fardeau M, Angelini C, Serrano C, Urtizberea JA, Hentati F, Hamida MB, Bohlega S, Culper EJ, Amato AA, Bossie K, Oeltjen J, Bejaoui K, McKenna-Yasek D, Hosler BA, Schurr E, Arahata K, de Jong PJ, Brown RH Jr. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb-girdle muscular dystrophy. *Nature Genet*, 1998; 20:31-36;

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; 12:2853-61;

Louhichi N, Triki C, Quijano-Roy S, Richard P, Makri S, Meziou M, Estournet B, Mrad S, Romero NB, Ayadi H, Guicheney P, Fakhfakh F. New FKRP mutations causing congenital muscular dystrophy associated with mental retardation and central nervous system abnormalities. Identification of a founder mutation in Tunisian families. *Neurogenetics*, 2004; 5:27-34;

Manya H, Chiba A, Yoshida A, Wang X, Chiba Y, Jigami Y, Margolis RU, Endo T. Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci*, 2004; 101:500-5;

Martin PT. The dystroglycanopathies: the new disorders of O-linked glycosylation. *Semin Pediatr Neurol*. 2005 Sep;12(3):152-8.

Matsumoto H, Hayashi YK, Kim DS, Ogawa M, Murakami T, Noguchi S, Nonaka I, Nakazawa T, Matsuo T, Futagami S, Campbell KP, Nishino. Congenital muscular dystrophy with glycosylation defects of alpha-dystroglycan in Japan. *Neuromuscul Disord*, 2005; 15:342-8;

McNally EM, Passos-Bueno MR, Bonnemann CG, Vainzof M, de Sa Moreira E, Lidov HG, Othmane KB, Denton PH, Vance JM, Zatz M, Kunkel LM. Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma-sarcoglycan mutations. *Am J Hum Genet*, 1996; 59:1040-1047;

Mercuri E, Brockington M, Straub V, Quijano-Roy S, Yuva Y, Herrmann R, Brown SC, Torelli S, Dubowitz V, Blake DJ, Romero NB, Estournet B, Sewry CA, Guicheney P, Voit T, Muntoni F. Phenotypic spectrum associated with mutations in the fukutin-related protein gene. *Ann Neurol*, 2003; 53:537-542;

Mercuri E, Topaloglu H, Brockington M, Berardinelli A, Pichiecchio A, Santorelli F, et al. Spectrum of brain changes in patients with congenital muscular dystrophy and FKRP gene mutations. *Arch Neurol* 2006; 63:251-7.

Messina DN, Speer MC, Pericak-Vance MA, McNally EM. Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23. *Am J Hum Genet*, 1997; 61:909-17;

Messina S, Mora M, Pegoraro E, Pini A, Mongini T, D'Amico A, Pane M, Aiello C, Bruno C, Biancheri R, Berardinelli A, Boito C, Farina L, Morandi L, Moroni I, Pezzani R, Pichiecchio A, Ricci E, Ruggieri A, Saredi S, Scuderi C, Tessa A, Toscano A, Tortorella G, Trevisan CP, Uggetti C, Santorelli FM, Bertini E, Mercuri E. POMT1 and POMT2 mutations in CMD patients: A multicentric Italian study. *Neuromuscul Disord*. 2008 May 29;

Michele DE and Campbell KP. Dystrophin-glycoprotein complex: Post-translational processing and dystroglycan function. *J Biol Chem*, 2003; 278:15457-15460;

Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, Satz JS, Dollar J, Nishino I, Kelley RI., Somer, H. Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature*, 2002; 418: 417-422;

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988 ; 16:1215;

Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, Masetti E, Mazzocco M, Egeo A, Donati MA, Volonte D, Galbiati F, Cordone G, Bricarelli FD, Lisanti MP, Zara F. Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet*, 1998; 18:365-8;

Moreira ES, Wilthire TJ, Faulkner G, Nilforoushan A, Vainzof M, Suzuki OT, Valle G, Reeves R, Zatz M, Passos-Bueno MR, Jenne DE. Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nature Genet*, 2000; 24:163-166;

Muchir A, Bonne G, van der Kooi AJ, van Meegen M, Baas F, Bolhuis PA, de Visser M, Schwartz K. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet*, 2000; 9:1453-9;

Muntoni F, Brockington M, Torelli S, Brown SC. Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol*, 2004; 17: 205-209;

Miyagoe-Suzuki Y, Nakagawa M, Takeda S. Merosin and congenital muscular dystrophy. *Res Tech* 2000;48(3-4):181-91.

Nigro V, Nigro V, Moreira ES, Piluso G, Vainzof M, Belsito A, Politano L, Puca AA, Passos-Bueno MR, Zatz M. Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat Genet*, 1996; 13:195-198;

Noguchi S, McNally EM, Ben Othmane K, Hagiwara Y, Mizuno Y, Yoshida M, Yamamoto H, Bonnemann CG, Gussoni E, Denton PH, Kyriakides T, Middleton L, Hentati F, Ben Hamida M, Nonaka I, Vance JM, Kunkel LM, Ozawa E. Mutations in the dystrophin-associated protein  $\gamma$ -sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science*, 1995; 270:819-822;

Ohlendieck K, Matsumura K, Ionasescu VV, Towbin JA, Bosch EP, Weinstein SL, Sernett SW, Campbell KP. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology*, 1993; 43:795-800;

Ohlendieck K. Towards an understanding of the dystrophin-glycoprotein complex: linkage between the extracellular matrix and the membrane cytoskeleton in muscle fibers. *Eur J Cell Biol*, 1996; 69:1-10;

Richard I, Broux O, Allamand V, Fougousse F, Chiannikulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C. Mutations in the proteolytic calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell*, 1995; 81: 27-40;

Roberds SL, Leturcq F, Allamand V, Piccolo F, Jeanpierre M, Anderson RD, Lim LE, Lee JC, Tome FM, Romero NB. Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell*, 1994; 78:625-633;

Sasaki T, Yamada H, Matsumura K, Shimizu T, Kobata A, Endo T. Detection of O-mannosyl glycans in rabbit skeletal muscle alpha-dystroglycan. *Biochim Biophys Acta*, 1998; 1425: 599-606;

Sciandra F, Schneider M, Giardina B, Baumgartner S, Petrucci TC, Brancaccio A. Identification of the beta-dystroglycan binding epitope within the C-terminal region of alpha-dystroglycan. *Eur J Biochem*. 2001 Aug;268(16):4590-7;

Sciandra F, Bozzi M, Bianchi M, Pavoni E, Giardina B, Brancaccio A. Dystroglycan and muscular dystrophies related to the dystrophin-glycoprotein complex. *Ann Ist Super Sanita*. 2003;39(2):173-81;

Sotgia F, Lee H, Bedford MT, Petrucci T, Sudol M, Lisanti MP. Tyrosine phosphorylation of beta-dystroglycan at its WW domain binding motif, PPxY, recruits SH2 domain containing proteins. *Biochemistry*. 2001 Dec 4;40(48):14585-92;

Speer MC, Vance JM, Grubber JM, Lennon Graham F, Stajich JM, Viles KD, Rogala A, McMichael R, Chutkow J, Goldsmith C, Tim RW, Pericak-Vance MA. Identification of a new autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy locus on chromosome 7. *Am J Hum Genet*, 1999; 64:556-62;

Speer MC, Yamaoka LH, Gilchrist JH, Gaskell CP, Stajich JM, Vance JM, Kazantsev A, Lastra AA, Haynes CS, Beckmann JS. Confirmation of genetic heterogeneity in limb-girdle muscular dystrophy: linkage of an autosomal dominant form to chromosome 5q. *Am J Hum Genet*, 1992; 50:1211-7;

Straub V, Campbell KP. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol*, 1997; 10:168-75;

Sveen ML, Schwartz M, Vissing J. High prevalence and phenotype-genotype correlations of limb girdle muscular dystrophy type 2I in Denmark. *Ann Neurol*, 2006; 59:808-15;

Takano A, Bonnemann CG, Honda H, Sakai M, Feener CA, Kunkel LM, Sobue G. Intrafamilial phenotypic variation in limb-girdle muscular dystrophy type 2C with compound heterozygous mutations. *Muscle Nerve*, 2000; 23:807-810;

Toda T, Kobayashi K, Takeda S, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Tachikawa M, Wang F, Nagai Y, Taniguchi K, Taniguchi M, Sunada Y, Terashima T, Endo T, Matsumura K. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD) and alpha-dystroglycanopathy. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2003 Jun;43(2):97-104.

Torelli S, Brown SC, Brockington M, Dolatshad NF, Jimenez C, Skordis L, Feng LH, Merlini L, Jones DH, Romero N, Wewer U, Voit T, Sewry CA, Noguchi S, Nishino I, Muntoni F. Sub-cellular localisation of fukutin related protein in different cell lines and in the muscle of patients with MDC1C and LGMD2I. *Neuromuscul Disord*, 2005; 15:836-43;

van der Kooi AJ, van Meegen M, Ledderhof TM, McNally EM, de Visser M, Bolhuis PA. Genetic localization of a newly recognized autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy with cardiac involvement (LGMD1B) to chromosome 1q11-21. *Am J Hum Genet*, 1997; 60:891-5;

Vieira NM, Schlesinger D, de Paula F, Vainzof M. Mutation analysis in the FKRP gene provides an explanation for a rare cause of intrafamilial clinical variability in LGMD2I. *Neuromuscul Disord* 2006; 16: 870-3.

von der Hagen M, Kaindl AM, Koehler K, Mitzscherling P, Hausler HJ, Stoltenburg-Didinger G, Huebner A. Limb girdle muscular dystrophy type 2I caused by a novel missense mutation in the FKRP gene presenting as acute virus-associated myositis in infancy. *Eur J Pediatr*, 2005; 165:62-3;

Wagner, John., Screening Methods for Detection of Unknown Point Mutations. [http://www-users.med.cornell.edu/~jawagne/screening\\_for\\_mutations.html#Single-Strand.Conformational](http://www-users.med.cornell.edu/~jawagne/screening_for_mutations.html#Single-Strand.Conformational).

Polymorphism, Accessed 2003 February 17

Walter MC, Petersen JA, Stucka R, Fischer D, Schroeder R, Vorgerd M, Schroers A, Schreiber H, Hanemann CO, Knirsch U, Rosenbohm A, Huebner A, Barisic N, Horvath R, Komoly S, Reilich P, Muller-Felber W, Pongratz D, Muller JS, Auerswald EA, Lochmuller H. FKRP (826C>A) frequently causes limb-girdle muscular dystrophy in German patients. *J Med Genet* 2004; 41:e50;

Walton JN and Nattrass FJ. On the classification, natural history and treatment of the myopathies. *Brain*, 1954; 77:169-231;

Weiler T, Bashir R, Anderson LV, Davison K, Moss JA, Britton S, Nylén E, Keers S, Vafiadaki E, Greenberg CR, Bushby CR, Wrogemann K. Identical mutation in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B or Myoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). *Hum Mol Genet*, 1999; 8:871-877;

Weiler T, Greenberg CR, Zelinski T, Nylén E, Coghlan G, Crumley MJ, Fujiwara TM, Morgan K, Wrogemann K. A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in Manitoba Hutterites maps to chromosome region 9q31-q33: evidence for another limb-girdle muscular dystrophy locus. *Am J Hum Genet*, 1998; 63:140-147;

Yamada H, Shimizu T, Tanaka T, Campbell KP, Matsumura K. Dystroglycan is a binding protein of laminin and merosin in peripheral nerve. *FEBS Lett*, 1994; 352:49-53;

Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN, An efficient procedure for genotyping single nucleotide *polymorphisms*. *Nucleic Acids Res*. 2001 Sep 1;29(17).

Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, Taniguchi K, Kano H, Mizuno M, Inazu T, Mitsuhashi H, Takahashi S, Takeuchi M, Herrmann R, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Toda T, Endo T.

Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell*. 2001; 1:717-24;

Zatz M , Vainzof M, Passos-Bueno MR. Limb-girdle muscular dystrophy: one gene with different phenotypes, one phenotype with different genes. *Curr Op Neurol*, 2000; 13: 511-517;

Zhang K, Kaufman RJ. Protein folding in the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Handb Exp Pharmacol*, 2006; 172:69-91;

Xing X, Lai M, Wang Y, Xu E, Huang Q. Overexpression of glucose-regulated protein 78 in colon cancer. *Clin Chim Acta*, 2006; 364:308-15;