



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

INDICE

RIASSUNTO	Pag. 4
SUMMARY	Pag. 10
INTRODUZIONE	Pag. 15
- Il distroglicano	Pag. 17
- α e β distroglicano	Pag. 19
- Glicosilazione dell' α -distroglicano	Pag. 21
- Meccanismo molecolare delle α -distroglicanopatie	Pag. 24
- I 6 geni coinvolti nelle α -distroglicanopatie	Pag. 25
- Distrofie muscolari congenite	Pag. 26
- Distrofie muscolari dei cingoli	Pag. 29
SCOPO	Pag. 31
MATERIALI E METODI	Pag. 33
- Immunoistochimica	Pag. 34
- Immunoblot	Pag. 35
- Analisi del DNA	Pag. 35
- Analisi di mutazione dei geni <i>FKRP</i> , <i>LARGE</i> , <i>POMT1</i> , <i>POMT2</i> , <i>FKTN</i> , <i>POMGnT1</i>	Pag. 36
- Conferma mutazioni	Pag. 42
RISULTATI	Pag. 44
- Popolazione dei pazienti studiati	Pag. 45
- Studio di immunoistochimica con IIH6	Pag. 45
- Studio di immunoblot con IIH6	Pag. 46
- Studio di mutazione di <i>FKRP</i> , <i>POMT1</i> , <i>POMT2</i> , <i>POMGnT1</i> , <i>FKTN</i> , <i>LARGE</i>	Pag. 47
- Studio dell' α -distroglicano nei pazienti mutati nelle varie glicosiltransferasi	Pag. 57
DISCUSSIONE	Pag. 59
FIGURE	Pag. 65
BIBLIOGRAFIA	Pag. 77

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 e 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. 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 (DG) è una glicoproteina, codificata da un unico gene *DAG1*, il cui prodotto viene post-traduzionalmente clivato in 2 subunità, α -distroglicano e β -distroglicano.

L' α -distroglicano (α -DG) 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 β -distroglicano (β -DG). Quest'ultimo è in grado di connettersi nel citoplasma con la distrofina, la caveolina-3 e altre proteine coinvolte nella trasduzione del segnale. Il peso molecolare previsto per l' α -DG è di circa 72 kDa, ma la glicosilazione modifica il peso molecolare in maniera tessuto dipendente (per esempio nel tessuto muscolare il peso molecolare è di 156 kDa).

Il DG garantisce la connessione e la stabilità tra gli elementi del citoscheletro e la matrice extracellulare ed è espresso in una ampia varietà di tessuti, quali muscolo scheletrico e cardiaco, sistema nervoso centrale e periferico ed epiteli.

Mentre non si conoscono malattie neuromuscolari associate a mutazioni dirette del DG, è ormai evidente l'importanza dei processi post-traduzionali coinvolgenti tale proteina nella patogenesi di molte distrofie muscolari.

Mutazioni in geni coinvolti nella glicosilazione dell' α -DG danno origine ad un gruppo di distrofie muscolari autosomiche recessive, definite come distroglicanopatie.

Le distroglicanopatie presentano forte eterogeneità fenotipica. Lo spettro fenotipico include distrofie muscolari ad esordio congenito con coinvolgimento di occhi e cervello (Walker-Warburg Syndrome (WWS), Muscle-Eye-Brain (MEB), Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD)) e forme più lievi di distrofia muscolare dei cingoli (LGMD). Geneticamente, le distroglicanopatie sono causate da mutazioni in almeno 6 geni *FKRP*, *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *FKTN* e *LARGE*. Tutti codificano per glicosiltransferasi putative o accertate.

Scopo del presente lavoro è la caratterizzazione molecolare di un vasto gruppo di pazienti affetti da distrofia muscolare congenita (CMD) e distrofia muscolare dei cingoli (LGMD) ad eziopatogenesi sconosciuta, derivare le correlazioni tra genotipo e fenotipo e contribuire all'ampliamento della comprensione dei meccanismi patogenetici di malattia.

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. Criteri di inclusione sono stati: a) CMD o LGMD ad eziologia sconosciuta (distrofina, α -sarcoglicano, disferlina, calpaina, caveolina, emerina, laminina- α 2 nella norma), b) valori di CK fluttuanti, debolezza durante stati febbrili, responsività agli steroidi.

Sono stati selezionati su questa base 234 pazienti; 146 con diagnosi di LGMD, 38 con diagnosi di CMD, 50 con miopatia/iperCKemia.

Immunoistochimica

Sezioni tagliate al criostato di biopsia muscolare sono state colorate con anticorpi diretti contro un epitopo glicosilato dell' α -DG e contro il core peptidico dell' α -DG. In 94 pazienti (94/234; 40%) è stato identificato un difetto parziale o totale di glicosilazione dell' α -DG. Di questi 84% (79/94) aveva un difetto parziale ed il 16% (15/94) aveva un difetto totale.

Immunoblot

L'immunoblot per l' α -DG è stato eseguito sulle biopsie muscolari di 47 pazienti in cui era stato riscontrato un deficit di α -DG in immunoistochimica. L'analisi ha consentito di quantificare il dato immunoistochimico ed ha evidenziato una discreta corrispondenza tra i dati di immunoistochimica e di immunoblot.

Studio di mutazione

L'analisi di mutazione è stata condotta sui 94 pazienti in cui era stato identificato un difetto di glicosilazione di α -DG. Mutazioni patogenetiche sono state identificate in 29 pazienti (29/94; 31%). In tutto sono stati identificati 47 alleli mutati (7 nuove mutazioni) su 58 (47/58; 81%): 28 in *FKRP*, 12 in *POMT1*, 4 in *POMT2*, 3 in *POMGnT1*. Non sono state identificate mutazioni nei geni *LARGE* e *FKTN*.

Undici pazienti (11/29; 38%) presentavano un deficit totale di glicosilazione dell' α -DG e 18 (18/29; 62%) parziale.

Concludendo, negli ultimi anni è diventato sempre più evidente il ruolo chiave del complesso delle glicoproteine associate alla distrofina nella patogenesi

delle distrofie muscolari. Il nostro lavoro conferma che le distroglicanopatie sono clinicamente e geneticamente eterogenee ed amplia lo spettro fenotipico associato a mutazioni nelle diverse glicosiltransferasi. Il basso tasso di mutazione osservato nel nostro gruppo di pazienti suggerisce che ulteriori geni possano essere coinvolti nella glicosilazione dell' α -DG.

SUMMARY

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

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

Muscular dystrophies etiopathogenesis involves perturbations of various extracellular matrix, sarcolemmal and subsarcolemmal proteins of the muscle fibres. A prominent role to stabilized muscle fibres is played by the dystrophin glycoprotein complex (DGC). The DGC is composed by dystrophin, sarcoglycans, distrobrevins, sintrophins, sarcospan and dystroglycan. Dystroglycan (DG) is glycosylated protein encoded by a single gene, *DAG1*, that is post-translationally cleaved into 2 subunits, α -dystroglycan and β -dystroglycan..

α -dystroglycan (α -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 β -dystroglycan (β -DG). β -DG interacts with the cytoplasmic domain of dystrophin, caveolin-3 and other proteins implicated in signal trasduction. The predicted molecular weight of α -DG is 72 kDa, but it can be modified by glycosylation. α -DG has in skeletal muscle a molecular weight of 156 kDa.

DG forms a link between the extracellular matrix and actin-associated cytoskeleton and stabilizes muscle fibres. DG is expressed in a large variety of tissues, including skeletal and cardiac muscle, central and peripheral nervous system and epithelia.

Primary mutations in the gene encoding DG have never been reported but the central role of post-traslational modifications of the protein is emerging in the pathogenesis of muscular dystrophies.

Alterations in α -DG glycosylation are responsible of a group of recessive autosomal muscular dystrophies called dystroglycanopathies.

The dystroglycanopathies show strong phenotypic heterogeneity. Phenotypic spectrum includes muscular dystrophies characterized by congenital onset with eye and brain involvement (Walker-Warburg Syndrome (WWS), Muscle-Eye-Brain (MEB), Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD)) and mild late-onset muscular dystrophies (LGMD). Mutations in 6 different genes: *FKRP*, *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *FKTN* and *LARGE* have been identified in these disorders. All these genes encode for putative or known glycosyltransferases.

The aim of this thesis is the molecular characterization of a large group of patients affected by CMD and LGMD with unknown etiopathogenesis, in order to extend genotype and phenotype correlations and to widen the knowledge of the pathogenetic mechanisms underlying muscular dystrophies.

Selection criteria

Patients were selected from the muscle biopsy database hosted in Neuromuscular Centre of University of Padova. The database contains over 8000 samples. Inclusion criteria were: a) CMD and LGMD with unknown etiology (normal dystrophin, α -sarcoglycan, dysferlin, calpain, caveolin, emerin, laminin- α 2), b) hyperCKemia, deteriorations of muscle strength during fever or steroid responsiveness. 234 patients were selected 146 affected by LGMD, 138 affected by CMD, 50 by myopathy/hyperCKemia.

Immunohistochemistry

Cryosections of muscle biopsies were immunostained with an antibody directed against a glycosylated epitope of α -DG and another antibody directed

against the DG peptidic core of α -DG. Partial or total α -DG glycosylation defect of were identified in 94 patients (94/234; 40%). 84% (79/94) of these patients showed variable reduction and 16% (15/94) complete absence of α -DG glycosylation.

Immunoblot

α -DG immunoblotting was performed on 47 patients with defective α -DG glycosylation in order to quantify the deficient muscle biopsies. This analysis confirmed the immunohistochemistry data in most of the cases.

Mutation analysis

Mutation analysis was performed on the 94 patient, in which we previously identified a defect of α -DG glycosylation. Pathogenetic mutations were identified in 29 patients (29/94; 31%). We identified 47 mutated alleles (7 novel mutations) out of 58 (47/58; 81%): 28 in *FKRP*, 12 in *POMT1*, 4 in *POMT2*, 3 in *POMGnT1*. No mutations were identified in *LARGE* and *FKTN* genes.

Eleven patients (11/29; 38%) showed total absence of α -DG glycosylation and 18 (18/29; 62%) showed partial α -DG glycosylation defect.

In conclusion, the pivotal role of α -DG glycosylation in the pathogenesis of muscular dystrophies has become evident in the last few years. Our study confirms the clinical and genetical heterogeneity of dystroglycanopathy and widens the phenotypical spectrum associated to mutations in the diverse glycosyltransferases. The low mutation rate found in this study suggests that other still unknown genes can be involved in α -DG glycosylation.

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 e 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 di stabilizzazione della membrana è svolta dal complesso multimerico delle glicoproteine associate alla distrofina (DGC; dystrophin-associated glycoprotein complex). Questo complesso multimerico DGC è formato da distrofina, sarcoglicani, distrobrevine, sintrofine, sarcospan, e distroglicano (Endo et al., 2003, Barresi et al., 2005) (Figura 1). Ruolo chiave nel complesso DGC ha il distroglicano (DG), che agisce come stabilizzatore della membrana durante la contrazione muscolare, connettendo la matrice extracellulare con il citoscheletro.

Il DG è una glicoproteina, codificata da un unico gene *DAG1*, il cui prodotto viene post-traduzionalmente clivato in 2 subunità, α -distroglicano (α -DG) e β -distroglicano (β -DG). Il DG è espresso in una ampia varietà di tessuti, quali muscolo scheletrico e cardiaco, sistema nervoso centrale e periferico ed epiteli (Sciandra et al., 2003).

L' α -DG 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 β -DG. Quest'ultimo è in grado di connettersi nel citoplasma con la distrofina, la caveolina-3 e altre proteine coinvolte nella trasduzione del segnale. Il peso molecolare previsto per l' α -DG è di circa 72 kDa, ma è modificato dalla glicosilazione in maniera tessuto-specifica. Per esempio

nel tessuto muscolare l' α -DG presenta un peso molecolare apparente di 156 kDa, mentre nel sistema nervoso centrale di 120 kDa (Barresi et al., 2005).

Attualmente non si conoscono malattie neuromuscolari associate a mutazioni del gene che codifica per il DG, probabilmente perché tali mutazioni sono letali nelle prime fasi di sviluppo embrionale (Williamson et al. 1997), tuttavia sta emergendo l'importanza dei processi post-traduzionali che coinvolgono questa proteina nell'eziopatogenesi delle malattie muscolari. In particolare la glicosilazione dell' α -DG ha una funzione critica per il mantenimento dell'integrità delle proteine della matrice extracellulare.

Anomali pattern di glicosilazione dell' α -DG causati da mutazioni in diverse glicosiltransferasi 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 e coinvolgimento multi-organo come la Walker-Warburg Syndrome (WWS), la malattia Muscle-Eye-Brain (MEB), la distrofia muscolare congenita di Fukuyama (FCMD), a forme di distrofia muscolare congenita senza alterazioni del Sistema Nervoso Centrale (MDC1C), a forme più lievi cingolari (distrofie muscolari dei cingoli (LGMD2L-O)). Geneticamente, le distroglicanopatie sono causate da mutazioni in almeno 6 geni che codificano per glicosiltransferasi putative o che agiscono su substrati noti: *FKRP*, *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *FKTN*, *LARGE* (Godfrey et al. 2007).

Il distroglicano (DG)

Il complesso multimerico DGC (Figura 2) è formato da diverse proteine (Ohlendieck et al., 1993, Crosbie et al., 1997, Blake 2002, Banks et al., 2003):

a) distrofina - connessa intracellularmente al β -DG, 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: α -sarcoglicano, β -sarcoglicano, γ -sarcoglicano e δ -sarcoglicano che formano un complesso multimerico associato alla distrofina. Mutazioni in geni che codificano per queste proteine sono responsabili delle sarcoglicanopatie;

c) distrobrevine - proteine omologhe alla distrofina, con cui interagiscono - suddivise in α -distrobrevina, di cui si conoscono 5 isoforme e β -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) distroglicano, che costituisce il nucleo del complesso.

Il DG è una glicoproteina espressa in molti tessuti, tra cui epitelio, sistema nervoso, muscolo cardiaco, e muscolo scheletrico. Il DG è costituito da un complesso di 2 subunità, α - e β - DG non covalentemente legate ed ha un ruolo di connessione tra citoscheletro e matrice extracellulare: l' α -DG si connette con la laminina della lamina basale e il β -DG, proteina transmembrana, si lega alla distrofina nel citoscheletro (Ervasti et al., 1993; Bowe et al., 1994; Peng et al., 1998).

In letteratura sono note diverse mutazioni a carico di geni che codificano per numerosi componenti del complesso DGC, ma non sono riportate mutazioni a carico del gene che codifica per il DG. Esperimenti condotti su modelli animali hanno

evidenziato come il topo knockout per *DAG1* arresti il suo sviluppo ai primi stadi embrionali, suggerendo che mutazioni di questo gene siano letali per l'embrione (Williamson et al., 1997).

α e β distroglicano

Il DG è un propeptide di 895 aminoacidi (Figura 3), codificato da un unico gene (*DAG1*) che viene separato in 2 subunità α e β . Il taglio post-traduzionale del precursore avviene al residuo Ser 654 (Ibraghimov-Beskrovnaya et al. 1992, 1993). L' α -DG è una proteina extracellulare, a cui si legano numerose proteine extracellulari, quali laminina (nella lamina basale), agrina, perlecano (2 proteoglicani eparan-solfati), biglicano (un proteoglicano condroitin-solfato) e neurexina nel cervello. È una proteina altamente glicosilata, la cui forma ricorda un manubrio e 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) nel legare le catene oligosaccaridiche, che a loro volta mediano i legami con le molecole extracellulari sopra ricordate. Recentemente è stato evidenziato che il dominio N-terminale, benché sia clivato nella proteina matura, è indispensabile per il riconoscimento del DG come substrato da parte di LARGE (glicosiltransferasi putativa). Il dominio C-terminale è unito non covalentemente al β -DG 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' α -DG si aggira attorno a 72 kDa, ma in immunoblot si osserva un peso molecolare variabile dai 156 kDa del muscolo

scheletrico, ai 140 nel cuore e 120 kDa del cervello e nervo periferico (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992, Yamada et al., 1994, Leschziner et al., 2000). Questa alta variabilità della massa molecolare dell' α -DG è il risultato di un diverso pattern di O-glicosilazione nel dominio mucinico dei tessuti scheletrico, cardiaco e cerebrale, pattern di glicosilazione che si modifica anche nelle diverse specie e fase di sviluppo dell'organismo (Ervasti et al., 1991, Sasaki et al., 1998).

L' α -DG oltre alla funzione strutturale ha un ruolo come recettore cellulare ed infatti può agire come recettore comune per virus e batteri (per esempio Arenavirus e *Mycobacterium leprae*), solo se la proteina nativa si conserva inalterata. Infatti la proteina ricombinante perde questa capacità legante, poiché non è mantenuta la sua corretta glicosilazione (Cao et al., 1998, Rambukkana et al., 1998).

Alterazioni nel pattern di glicosilazione dell' α -DG sono legate anche alla progressione di tumori epiteliali (per esempio prostata e seno) suggerendo che la perturbazione dello stretto legame formato dal DG e la matrice cellulare faciliti la replicazione delle cellule tumorali (Henry et al., 2001, Muschler et al., 2002, Sgambato et al., 2003).

Il β -DG è una proteina transmembrana con peso molecolare di 43 kDa che si lega, intracellularmente, tramite numerosi residui prolinici che facilitano l'interazione proteina-proteina, con diverse proteine (Henry et al., 1999, Banks et al., 2003, Hayashi 2003, Michele et al, 2003):

- a) distrofina, la quale a sua volta si connette al citoscheletro per mezzo dell'actina;
- b) utrofina, proteina omologa della distrofina;
- c) rapsina, una proteina post-sinaptica deputata alla stabilizzazione e promozione dell'aggregazione del recettore per l'acetilcolina;

d) α -dystrobrevina, che contiene un dominio EF-hand, struttura ritrovata in una grande famiglia di proteine che legano il calcio;

e) caveolina-3, proteina localizzata nella membrana muscolare 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 (beta-dystroglycan-growth factor receptor 2), una proteina coinvolta sia nella comunicazione cellulare che nella trasduzione del segnale.

A livello di membrana, il β -DG si connette tramite il suo dominio transmembrana con i sarcoglicani, mentre extracellularmente si connette all' α -DG. La coda C-terminale ricca in prolina del β -DG contiene un motivo PPXY (prolina prolina X tirosina) che si lega a un dominio contenente triptofano (WW domain) presente nella distrofina; legame stabilizzato dai 2 domini EF-hand leganti il calcio del β -DG. Il β -DG 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 implicato nella modulazione delle interazioni tra citoscheletro e membrana (Kock et al., 1991, Jung et al. 1995, Yang et al., 1995, James et al., 2000, Sotgia et al., 2001).

Glicosilazione dell' α -DG

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, quali la differenziazione cellulare, lo sviluppo, ecc. Per mantenere la glicosilazione delle proteine, la cellula utilizza 2 meccanismi: il controllo dell'espressione delle glicosiltransferasi (gli enzimi direttamente coinvolti nel montaggio dei residui glucidici) ed il controllo dell'espressione dei suoi substrati specifici. I residui glucidici delle glicoproteine sono vari: il glucosio, il galattosio, il mannosio, il fucosio, l'acido sialico, la glucosamina, la galattosamina 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 NH₂ 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 glucosamina (GluNAc), con lo zucchero in configurazione β, 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*-acetilglucosamina) 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 completa la sua maturazione 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, Lehle et al., 2006);

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 α (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 DG. Inizialmente la *O*-mannosilazione era stata riscontrata nei lieviti e in alcuni funghi e 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' α -DG, il cui dominio mucinico viene aggiunto di diversi residui glucidici terminanti con fucosio o acido sialico (Figura 4). La struttura glucidica più presente e caratterizzata di questi residui è un tetrasaccaride ($\text{Neu5Ac}\alpha\text{2-3Gal}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-2Man}\alpha\text{-Ser/Thr}$, descritto nei mammiferi solo sull' α -DG), che possiede un ruolo fondamentale nel gestire l'interazione con la laminina. Esistono comunque diverse varianti strutturali del tetrasaccaride sopra descritto. L' α -DG è provvisto, oltre che delle catene di mannosio sopra citate, anche della più comune *N*-acetilgalattosamina ($\text{Gal}\beta\text{1-3GalNAc}\alpha\text{-Ser/Thr}$) (Endo 2005, Lehle et al., 2006, Sciandra et al., 2007).

Meccanismo molecolare delle α -dystroglicanopatie

Le α -dystroglicanopatie sono un gruppo eterogeneo, clinicamente e geneticamente, di distrofie muscolari autosomiche recessive, definite da ridotta o assente glicosilazione dell' α -DG. Così nominate per la prima volta nel lavoro di Toda (Toda et al. 2003) sono dovute a mutazioni in un gruppo di geni che codificano per enzimi la cui funzione di glicosilazione risulta alterata, modificando direttamente o indirettamente le catene di mannosio dell' α -DG. L'ipoglicosilazione del DG comporta una destabilizzazione del complesso multimerico DGC, che modifica l'affinità dell' α -DG ai suoi naturali ligandi (laminina, argina, ecc.), e che di conseguenza provoca una minore stabilità dell'intera struttura di connessione tra citoscheletro e lamina basale.

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

L'aberrante glicosilazione del DG dovuta a mutazioni nei geni codificanti per glicosiltransferasi può comportare sia alterazioni muscolari che anomalie cerebrali e oculari.

Fenotipicamente le dystroglicanopatie si manifestano con un ampio spettro di severità, passando da forme relativamente miti ad esordio tardivo senza coinvolgimento di altri organi (LGMD), a forme più severe ad esordio precoce con coinvolgimento multisistemico (WWS, MEB, FCMD, CMD) (Godfrey et al. 2007).

La corretta glicosilazione del DG, che avviene attraverso l'azione sequenziale di una serie di enzimi e la specifica funzione delle sue catene glucidiche nelle interazioni con i ligandi, sono ancora oggi oggetto di intenso studio. Si conoscono 3

glicosiltransferasi a substrato noto: POMT1 (protein-*O*-mannosyltransferase 1), POMT2 (protein-*O*-mannosyltransferase 2) e POMGnT1 (protein *O*-linked mannose beta1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase). POMT1 catalizza il primo passo nella maturazione dell' α -DG, legando a quest'ultimo residui glucidici tramite *O*-mannosilazione (Jurado et al., 1999). POMT2 è un enzima con attività simile a POMT1, con cui viene co-espresso per formare un complesso che trasferisce residui di mannosio (Willer et al., 2002). POMGnT1 catalizza il secondo passo nella biosintesi dell' α -DG, trasferendo il residuo di *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) attraverso il legame β 1,2 sul mannosio precedentemente ancorato al DG (Zhang et al., 2002). Questi 3 enzimi presenti nel reticolo endoplasmatico sono stati caratterizzati molecularmente e biochimicamente (Yoshida et al., 2001, Manya et al., 2004, Akasaka-Manya et al., 2004).

Esistono poi altre 3 glicosiltransferasi putative, FKTN (fukutin), FKRP (fukutin related protein), LARGE (like-glycosyltransferase). Questi enzimi sono stati identificati per omologia di sequenza a glicosiltransferasi note, ma attualmente mancano conoscenze approfondite circa 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 α -dystroglicanopatie

Mutazioni nei 6 geni responsabili della *O*-glicosilazione dell' α -DG, *FKRP*, *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *FKTN*, *LARGE*, danno origine a varie forme di distrofie muscolari dei cingoli e a varie forme di distrofie muscolari congenite.

Mutazioni nel gene *POMT1* sono state riscontrate sia in forme di distrofia muscolare congenita severa ad esordio precoce e con alterazioni strutturali del sistema nervoso centrale e occhi (WWS, MEB), che in forme di distrofia muscolare

congenita senza alterazioni strutturali sistema nervoso centrale, ma con ritardo mentale (FCMD, CMD), che in forme cingolari (LGMD2K). Analoga eterogeneità clinica si è osservata nelle mutazioni dei geni *POMT2*, *FKRP*, *POMGnT1*, *FKTN* e *LARGE* (Tabella 1) (Barresi et al., 2005, Marti net al., 2005, Godfrey et al., 2007).

Tabella 1. Spettro fenotipico associato a mutazioni nelle glicosiltransferasi coinvolte nella *O*-glicosilazione dell' α -DG

	WWS	MEB	CMD	LGMD
FKRP	WWS	MEB	MDC1C	LGMD2I
POMT1	WWS	MEB	FCMD	LGMD2K
POMT2	WWS	MEB	FCMD	LGMD2N
POMGnT1	WWS	MEB	FCMD	LGMD2M
FCMD	WWS		FCMD	LGMD2L
LARGE	WWS		MDC1D	

Distrofie muscolari congenite

Le distrofie muscolari congenite sono un gruppo di malattie autosomiche recessive clinicamente eterogenee, caratterizzate da debolezza muscolare diffusa, spesso simmetrica e prevalentemente prossimale ad esordio congenito o nei primi 6 mesi di vita e con vari gradi di severità. L'evoluzione è variabile, così come l'interessamento dell'apparato respiratorio e del cuore. Spesso si associano a ritardo mentale e difetti strutturali del sistema nervoso centrale e dell'occhio. Esordiscono

solitamente entro il primo anno di vita e sono relativamente frequenti nella popolazione (Mostacciuolo et al., 1996, Miyagoe-Suzuki et al. 2000).

Dal punto di vista biochimico, le distrofie muscolari congenite possono essere suddivise in: miopatie caratterizzate da mutazioni nei geni che codificano per proteine che glicosilano l' α -DG (come *FKRP*, *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *FKTN*, *LARGE*) oppure miopatie causate da difetti genetici che coinvolgono direttamente molecole della matrice extracellulare (come laminina α 2, integrina α 7, collagene VI) o miopatie caratterizzate da alterazioni del reticolo endoplasmatico (come la sindrome della spina rigida, *RSMD1*).

Le distrofie muscolari congenite con deficit totale di laminina α 2, denominate *MDC1A*, sono caratterizzate da deficienza di merosina (laminina α 2) e costituiscono la CMD più frequente nei paesi occidentali (Tomè et al., 1994). La laminina è uno dei componenti principali della lamina basale ed è una proteina eterotrimerica a forma di croce composta da una catena pesante (α) e da due catene leggere (β e γ) (Timpl et al., 1979). La laminina α 2 si colloca “a ponte” con la mediazione dei suoi recettori muscolo-specifici, DG (Campbell, 1995) e integrina α 7 (Vachon et al., 1997), fra la matrice extracellulare ed il citoscheletro intracellulare contribuendo in questo modo alla stabilizzazione della membrana muscolare.

Le caratteristiche cliniche salienti delle forme merosino-negative di CMD sono esordio neonatale di debolezza muscolare ed ipotonia, contratture congenite, ritardo marcato nella acquisizione delle tappe motorie, decorso clinico severo con impossibilità a raggiungere la deambulazione autonoma, alterazione di segnale della sostanza bianca nelle regioni periventricolari e subcorticali alla risonanza magnetica (RMN) raramente associate ad alterazioni della migrazione neuronale (Dubowitz, 1994, 1999, Dubowitz et al., 1995, Philpot et al., 1995; van der Knaap et al., 1997; Caro et al., 1999). I pazienti con deficit totale di laminina α 2 presentano mutazioni

nel gene per la laminina $\alpha 2$ (Helbling-Leclerc et al., 1995, Hayashi et al., 1995; Pegoraro et al., 1996, Guicheney et al., 1997, 1998, Pegoraro et al., 1998). Vi sono anche deficit parziali primari di laminina $\alpha 2$, che danno origine ad un gruppo clinicamente eterogeneo di CMD. Deficit parziali sono stati descritti in pazienti affetti da CMD di tipo classico (Nissinen et al., 1996; Tan et al., 1997; Sewry et al., 1997; Allamand et al., 1997; Naom et al., 1998; Naom et al., 2000; Pegoraro et al., 2000) e in pochi pazienti con un fenotipo tipo cingoli (Hayashi et al., 1997; Di Blasi et al., 2000). Di solito il fenotipo clinico in questi pazienti è più mite che nei pazienti con CMD e deficit totale di laminina $\alpha 2$.

Deficit secondari di laminina $\alpha 2$ si osservano anche in CMD associate ad alterazioni strutturali del sistema nervoso centrale, come la FCMD (Hayashi et al., 1993), la MEB (Haltia et al., 1997).

Fra le CMD dovute a mutazioni in glicosiltransferasi la distrofia muscolare congenita con ipertrofia muscolare ed insufficienza respiratoria (MDC1C) è dovuta a mutazioni nel gene *FKRP*. L'esordio di questa forma di CMD è nelle prime settimane di vita ed è caratterizzato da ipotonia e difficoltà nell'alimentazione. I pazienti non raggiungono l'abilità di camminare ed il fenotipo clinico è caratterizzato da ipertrofia muscolare dei quadricipiti e gastrocnemi con prevalente atrofia dei deltoidi e pettorali. Usualmente lo sviluppo intellettuale è normale e la RMN cerebrale nella norma (Brockington et al., 2001). I pazienti con MDC1C mostrano alla biopsia muscolare un deficit secondario di laminina $\alpha 2$ ed un difetto di glicosilazione di α -DG.

Tra le distrofie muscolari congenite associate ad alterazioni del Sistema Nervoso Centrale (SNC) ritroviamo FCMD, MEB e WWS.

Clinicamente la WWS si caratterizza per distrofia muscolare congenita, difetto di migrazione neuronale con lissencefalia, agenesia del corpo calloso,

idrocefalo, agenesia dei lobi olfattori e ipoplasia cerebellare. A livello oculare è frequente il riscontro di microftalmia, anomalie retiniche, glaucoma e malformazioni della camera anteriore. I geni mutati identificati originariamente in associazione con WWS sono stati *POMT1* e *POMT2*, i cui prodotti enzimatici formano un eterodimero che catalizza la *O*-mannosilazione dell' α -DG (de Berbabé et al. 2003).

La MEB fu originariamente descritta nella popolazione finlandese 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' α -DG (Yoshida et al., 2001). È una forma usualmente più mite di WWS e si caratterizza per distrofia muscolare associata ad anomalie di girazione neuronale, ipoplasia del tronco e cervelletto e alterazioni di segnale della sostanza bianca. Frequentissima è la miopatia severa, le opacità del cristallino ed il glaucoma.

La FCMD è prevalente in Giappone (è la seconda distrofia muscolare più frequente dopo la distrofia muscolare di Duchenne). FCMD è causata dall'inserzione di un retrotrasposone nella regione 3' non tradotta del gene *FKTN* e da rare mutazioni puntiformi. Anche in questo caso si associano alla distrofia muscolare alterazioni strutturali del SNC (anomalie di girazione, alterazioni di segnale della sostanza bianca) e raramente alterazioni retiniche (Kobayashi et al., 1998, Adams et al., 2006, Messina et al., 2008).

Distrofie muscolari dei cingoli (LGMD)

Benché già individuate alla fine del diciannovesimo secolo, il primo tentativo di classificazione delle distrofie muscolari è dovuto a Walton e Nattrass che 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 in assenza di una trasmissione della malattia legata al cromosoma X (Walton et al., 1954). La difficoltà di una classificazione univoca delle LGMD deriva dall'estrema eterogeneità clinica e genetica della malattia, che include forme ad esordio al cingolo scapolare o pelvico, progressione rapida e lenta, trasmissione autosomica recessiva (LGMD2) e dominante (LGMD1) (Bushby et al., 1995; Bushby, 1996, Hewitt et al., 2003).

Oggi si conoscono 19 forme di LGMD (Bushby 1999, Lo et al., 2008). Le distroglicanopatie sono forme a trasmissione autosomica recessiva: LGMD2I è dovuta a mutazioni nel gene *FKRP*, LGMD2K a mutazioni nel gene *POMT1*, LGMD2L nel gene *FKTN*, LGMD2M nel gene *POMGnT1* e LGMD2N nel gene *POMT2* (Tabella 1) (de Bernabé et al, 2003, Adams et al., 2006).

La LGMD2I è caratterizzata da debolezza muscolare progressiva ad esordio variabile dall'infanzia all'età adulta. Si associa spesso ad ipertrofia degli arti inferiori, macroglossia, cardiomiopatia dilatativa ed insufficienza respiratoria restrittiva. La RMN cerebrale e lo sviluppo cognitivo sono nella norma nella LGMD2I (de Paula et al., 2003). Nella LGMD2I la mutazione missenso C826A è una mutazione comune presente in circa 40-50% degli alleli mutati (Brockington et al., 2001, de Bernabè et al., 2003).

La LGMD2K si caratterizza per distrofia muscolare di grado variabile e ritardo mentale anche severo (Balci et al., 2005).

La LGMD2N e LGMD2M sono state descritte in rarissimi pazienti con fenotipo clinico relativamente mite senza alterazione del SNC (Biancheri et al., 2007, Clement et al., 2008).

La LGMD2L è una forma a fenotipo intermedio di LGMD. Nei pazienti con LGMD2L, la RMN cerebrale è normale mentre il deficit di forza presenta caratteristiche fluttuazioni della forza muscolare associate a stati febbrili e risponde positivamente alla terapia steroidea (Godfrey et al., 2006).

SCOPO

Lo spettro fenotipico delle distroglicanopatie legate a mutazioni nei geni conosciuti *FKRP*, *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *FKTN* e *LARGE* è molto ampio ed in continua evoluzione. Il paradigma “un gene-una malattia” (fenotipo) non si applica ormai più alle distroglicanopatie e va rivisitato in “un gene-fenotipi multipli”. Questo studio si prefigge di ampliare le conoscenze dei rapporti genotipo/fenotipo nelle distrofie muscolari dei cingoli e nelle distrofie muscolari congenite da difetto di glicosilazione.

Le basi metodologiche da cui partire hanno previsto la caratterizzazione biochimica del pattern di glicosilazione dell' α -DG in una eterogenea popolazione di pazienti affetti da distrofia muscolare congenita o distrofia muscolare dei cingoli ad eziologia sconosciuta, selezionati dalla Banca dati delle biopsie muscolari del Centro delle Malattie Neuromuscolari dell'Università di Padova. Questo screening ha consentito la selezione di un gruppo di pazienti ai quali applicare, con un approccio di gene-candidato, la ricerca di mutazione nei geni codificanti glicosiltransferasi note.

La conoscenza dell'esatto spettro fenotipico legato a mutazioni delle diverse glicosiltransferasi ci consente di identificare sottogruppi di pazienti con fenotipi atipici che altrimenti sarebbero sfuggiti ad una diagnosi molecolare; l'identificazione di gruppi molecularmente omogenei di pazienti è il presupposto per poter applicare protocolli terapeutici mirati quando disponibili. La conoscenza delle basi molecolari delle malattie ci consente di offrire una consulenza genetica adeguata e di ridurre i casi famigliari ricorrenti.

MATERIALI E METODI

Il gruppo di pazienti oggetto di questo studio è stato selezionato dalla Banca dati delle biopsie muscolari del Centro delle Malattie Neuromuscolari, Dipartimento di Neuroscienze, Università degli Studi di Padova. La banca dati comprende attualmente più di 8000 campioni di biopsia muscolare correlati da dati clinici, biochimici e molecolari.

I pazienti inclusi nello screening rispondevano ad uno o più dei seguenti criteri: a) diagnosi di distrofia muscolare congenita o distrofia muscolare dei cingoli ad eziologia sconosciuta (normale distrofina, calpaina, disferlina, caveolina, emerina, α -sarcoglicano, laminina- α 2); b) miopatia con valori di CK fluttuanti, debolezza muscolare che si accentua durante stati febbrili e responsività agli steroidi. Sulla base di questi criteri sono stati selezionati 234 pazienti.

Immunoistochimica

Sezioni di 10 μ m di biopsia muscolare ottenute al criostato sono state posizionate su vetrino pre-trattato (elettrostatato o gelatinato). La sezione è stata incubata per tutta la notte con l'anticorpo primario IIH6 (1:100) (Upstate) (Ervasti et al., 1991) che riconosce un epitopo glicosilato dell' α -DG e con l'anticorpo anti-core peptidico dell' α -DG (1:100) (Hermann et al., 2000). L'anticorpo secondario utilizzato per visualizzare la reazione è stato un anticorpo anti-topo IgM coniugato con TEXAS RED (1:100) (Calbiochem). I vetrini sono stati visualizzati con microscopio a epifluorescenza e fotografati con videocamera digitale. Le immagini al microscopio sono state esaminate da almeno tre investigatori indipendenti. L'intensità della reazione è stata valutata, in relazione ai controlli, secondo la

seguinte classificazione semiquantitativa: - : assenza di α -DG, +/- : riduzione di α -DG, + : normale presenza di α -DG.

In ogni esperimento sono stati utilizzati sia un controllo positivo (biopsia di paziente noto con assenza di α -DG) che un controllo negativo (biopsia di paziente sano).

Immunoblot

L'immunoblot per la porzione glicosilata dell' α -DG è stato effettuato sulle biopsie di 47 pazienti che presentavano alla fluorescenza un difetto di glicosilazione di α -DG. Circa 20/30 sezioni al criostato di biopsia muscolare sono state solubilizzate in tampone SDS, per ottenere una concentrazione finale di circa 40 μ g di proteine totali. I campioni sono stati caricati in un gel di poliacrilamide a gradiente (3.5%-12%) e separati su campo elettrico. I gel sono stati trasferiti su membrana di nitrocellulosa. La nitrocellulosa è stata lasciata asciugare all'aria e poi saturata tutta la notte in latte. L'anticorpo primario IIH6 (1:500) (Upstate) è stato incubato per un'ora (Ervasti et al., 1991). Il secondario è stato un anticorpo anti-topo 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 dai linfociti di sangue periferico raccolto in EDTA (Miller et al, 1988).

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

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, *FKTN*; 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 *FKTN* contiene 10 esoni di cui 9 codificanti, il gene *LARGE* contiene 16 esoni di cui 14 codificanti, il gene *FKRP* contiene 4 esoni di cui 1 solo codificante. I primers per amplificare gli esoni delle 6 glicosiltransferasi sono stati generati tramite l'utilizzo del programma gratuito Primer3 (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi).

L'amplificazione dei prodotti di PCR (che include oltre alla regione codificante anche le regioni degli accettori e donatori di splicing) 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 µM di ciascun primer, 2 unità di Taq DNA polimerasi (GOLD Taq, Applied Biosystem), magnesio cloruro 2 mM (Applied Biosystem) e il buffer specifico 10X per la Taq (Applied Biosystem).

Le condizioni di amplificazione sono state: 10 minuti a 95°C per attivare la Taq termosensibile, 35 cicli di: 30 secondi a 94°C per denaturare, 30 secondi a temperature variabili per i vari set di primers a seconda del loro contenuto di GC per l'appaiamento, 30 secondi a 72°C per l'estensione, e 10 minuti per l'estensione finale

di a 72°C. La temperatura di appaiamento delle coppie di primers è indicata in Tabella 2.

Gli amplificati sono stati controllati in gel d'agarosio e successivamente analizzati con la tecnica di analisi conformazionale dei polimorfismi a singolo filamento (SSCP - Single-Strand Conformation Polymorphism) (Orita, M., et al. 1989). Questa tecnica permette di evidenziare amplificati con pattern di migrazione anomalo in un gel non-denaturante di poliacrilamide, rispetto a un DNA di controllo (Sunnucks et al., 2000). La procedura separa i diversi frammenti a singola elica di DNA in base alla loro diversa mobilità elettroforetica, mobilità che si modifica a seconda della differente conformazione assunta nel gel e conseguentemente alla loro diversa sequenza nucleotidica (Wagner J., Accessed 2003 February 17). I campioni vengono denaturati a 95°C e rapidamente raffreddati in ghiaccio, successivamente sono caricati nel gel con l'aggiunta del buffer di caricamento. I campioni vengono separati su un gel di poliacrilamide al 5%. La corsa dura in genere 4 ore a temperatura ambiente. Il gel viene colorato con nitrato d'argento e sviluppato in soluzione basica con formaldeide per valutare il pattern di migrazione. Il gel viene scannerizzato e l'immagine digitale viene conservata su supporto informatico.

I conformers evidenziati con SSCP sono stati riamplicati usando gli stessi set di primers originari; i prodotti di PCR vengono purificati (purification kit GE Healthcare) e sequenziati direttamente. La sequenza viene effettuata presso BMR-Genomics (Cribi - Padova). I cromatogrammi ed 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 al fine di evidenziare mutazioni.

Tabella 2. Primers utilizzati per le varie glicosiltransferasi

GENE	NOME PRIMER	SEQUENZA	TEMPERATURA DI APPAIAMENTO
FKRP	FKRP 1F	TGCTGCCTTCCCTTTCGTCC	67°C
	FKRP 1R	AATGCCTCGAACTCCCGCAC	
	FKRP 2F	CTGCAGCACCAGCCTAGGAA	65°C
	FKRP 2R	CTAGGGCCACAACTCGGTG	
	FKRP 3F	CATCCCCAACGTGCGTCT	65°C
	FKRP 3R	AGGCACCTGGCAGGGTTG	
	FKRP 4aF	CCGAGTTTGTGGCCCTAGTA	65°C
	FKRP 4aR	CAGGAGCACCACAGCATCT	
	FKRP 4bF	AACGTCAGCCTGCGAGAGT	65°C
	FKRP 4bR	CCTTCCAGCTCACTAGGC	
	FKRP 5F	CTTTCTGCAGACCGCCCTTC	65°C
	FKRP 5R	CGCCCTCGAGCCAGTAGC	
	FKRP 5aF	AGCTGCTGGACTTGACCTTC	65°C
	FKRP 5aR	CGTGGTCTCCTTGTTCAG	
	FKRP 6F	CTACGAGGAGCGCTGGAC	60°C
	FKRP 6R	GTA CTGCACGCGGAAAAAGT	
FKRP 7F	ACTTGGAGGACGTGGGCAAC	65°C	
FKRP 7R	CAGGAAGCGGCGGTAGTTGT		
FKRP 8F	GAGTTTCCCGAGCACTTCCT	65°C	
FKRP 8R	CCAGCCTTCTCTCATGCTCT		
POMT1	POMT1ex2F	GATCCCTTCTGTAGCCTCTC	55°C
	POMT1ex2R	CTGGGAATGGAGTCATTTAG	
	POMT1ex3F	CAAAGTCATTTGGAACACA	55°C
	POMT1ex3R	GTAGGGGCTACTCTCCTGAT	
	POMT1ex4F	TGCATCTTGT TTTATTGCTTG	55°C
	POMT1ex4R	GCACAT TAAAAGGGAAATGA	
	POMT1ex5F	CAGTGTGGTTGCTTTTCCAG	55°C
	POMT1ex5R	ACCAAGCCCATGTGATCTTC	
	POMT1ex6F	CATACGTTTCCCTTGCTAC	55°C
	POMT1ex6R	CACCCAGAATCTCTGTTCTC	
	POMT1ex7F	CTCTGAAGAATGTGGAGCTT	60°C
	POMT1ex7R	CTGCAAAGACATGACAGAAA	
	POMT1ex8F	TTTCTGTCATGTCTTTGCGAG	55°C
	POMT1ex8R	GATTGGAGTCTTTTCACCAA	
	POMT1ex9F	GCAGTGAACATGACTTTTC	55°C
	POMT1ex9R	GATGCCCACTGCTTACTTAC	
	POMT1ex10F	CAACCTTCTGCTTCTGTCTC	55°C
	POMT1ex10R	CCTCAAAGAAAGGGAAAGTT	
	POMT1ex11F	TCCCCAAAGTGCTCTGATTAC	55°C
	POMT1ex11R	AGCTCTGCTCTGGAGTCAC	
POMT1ex12F	CTGTTAGTTTCGAGGGGACCA	60°C	
POMT1ex12R	ACCACAGAGGAAACCCACAG		
POMT1ex13F	CTTCCAGAGGAGTTCAAGGA	53°C	
POMT1ex13R	TTCACTACTGACGGTTGTGG		

	POMT1ex14F	CATTGTTTGGTGACAGGTCT	55°C
	POMT1ex14R	CTTGGGAAACAGACTGGAG	
	POMT1ex15F	CTTTACTCTCCTGCGGTGT	55°C
	POMT1ex15R	GAACTCTGGGGTGTATCAA	
	POMT1ex16F	ATCTGTTATGCCCTTGTCTG	55°C
	POMT1ex16R	ACTCTGGTTTGAGTCCTGTG	
	POMT1ex17F	TACTCCTTTGACCAAATCCA	55°C
	POMT1ex17R	GGAATTCTCAAGAAACAGGA	
	POMT1ex18F	TAAAGTAGTGCGTGCATCTG	55°C
	POMT1ex18R	CCATGTGGGAGAGGTAATAA	
	POMT1ex19F	AGCAGCAGAGTCGGTGTAGC	60°C
	POMT1ex19R	CGGTCCAGCCACTGTCTC	
	POMT1ex20F	GACAGCAGATGCCAAGAG	55°C
	POMT1ex20R	GGTGTCTTTGCCACACTC	
POMT2	POMT2ex1F	CTGGTCAGACAAAGTGTGC	60°C
	POMT2ex1R	GAGTCCCTCCCATCACTC	
	POMT2ex2F	ATTGTTTGAAATGCATAGCC	55°C
	POMT2ex2R	AGAGCTGCTATTCACCACAC	
	POMT2ex3F	AGAGGAATCTTCTCCCAAAG	55°C
	POMT2ex3R	GTCCATTTCAAGTCAGGAAG	
	POMT2ex4F	AGGTCCCCTGTCTTAAATGT	55°C
	POMT2ex4R	CCATGGTATGGCTAAGACAA	
	POMT2ex5F	TCTCTTACCTCGCTTTTTTCA	55°C
	POMT2ex5R	TTACAGAAATTTTGGAGTTGC	
	POMT2ex6F	CAAATTGAACTCCGTCTTGT	55°C
	POMT2ex6R	AAAACATTTCCACAGCAAAC	
	POMT2ex7F	AATGAGGTCTCACATGCCTA	55°C
	POMT2ex7R	TAACCACAGACCCAGAAAAT	
	POMT2ex8F	TGACTCTCTTCTGCTCTTCC	55°C
	POMT2ex8R	AATAACCCAAAGCCATCATA	
	POMT2ex9F	GAGTCTCGCAGAGGGTTAG	55°C
	POMT2ex9R	CGTACAAGTGCACAAAAGG	
	POMT2ex10F	CAGCTGTGCTGATAGTGATG	55°C
	POMT2ex10R	AGGGAGTAACAGCACAAGAA	
	POMT2ex11F	TACCAGTAGGCCCTTGATTA	55°C
	POMT2ex11R	TGCCCCGTACCATTTATTTAT	
	POMT2ex12F	AATGTTGCACATCATCTTCT	55°C
	POMT2ex12R	AGCCTCTTATCCTCAGGAAC	
	POMT2ex13F	CCTTTCTGACACGTTTTTCTC	55°C
	POMT2ex13R	GACAGCAAAACCTAGAGAC	
	POMT2ex14F	CATGTGGAAAAGAGAAGGAG	55°C
	POMT2ex14R	TATAAATGCTTCCCTCCAGA	
	POMT2ex15F	ATGGACAGACTGAGGAAAGA	55°C
	POMT2ex15R	TCTTAGAGACGCCATGAAAT	
	POMT2ex16F	ACATTTCTGTCAGCCCTCTA	55°C
	POMT2ex16R	TCTCCCTGCTCTTGTCTT	
	POMT2ex17F	CTGTCTGTGGAAGGTGACCA	60°C
	POMT2ex17R	ACCTGTGCAGAAATGGGAAT	
	POMT2ex18F	ATCTGCCATTCCCATTTCT	60°C

	POMT2ex18R	GGTGGTAAACGCAAAGGATG	
	POMT2ex19F	TGTCTTCTGACTGGGCTGTG	60°C
	POMT2ex19R	CTGCTCTGTCTCCCAAGTCC	
	POMT2ex20F	GACTCCAGGTTTCTCTCCTC	55°C
	POMT2ex20R	GCACTGGTGGTGTAAAAG	
	POMT2ex21F	GCCTCCTACTGGTTCTCTCT	55°C
	POMT2ex21R	GGATGGTCCAGTACTGCTT	
POMGnT1	MEB-1F	GAGCATCTTACCCCATGTGG	60°C
	MEB-1R	CCCAGTGCCTGATTTAGGTGG	
	MEB-2F	TCTTCACTGCAGCCAGGGCC	67°C
	MEB-2R	TAGGGTCTGCCTGCCACTCC	
	MEB-3F	AGGGCTAGGCTAAGGATGGG	60°C
	MEB-3R	CAGTGGACCATGCCCTGAGC	
	MEB-4F	TACCCCTAAGACAGAGACACC	60°C
	MEB-4R	TGGTGAGTTGGTGTCAATCAGC	
	MEB-5F	TGGGTGACCCAGAGGGCTGG	60°C
	MEB-5R	TATGAGGGGCAGAGAAGCCGG	
	MEB-6F	TCGTGCTCTGTGAGGCCAGG	60°C
	MEB-6R	AGGGTTCTGCTCCTCCCAGG	
	MEB-7F	GTTGGATGAAAGTAGGCAGGG	60°C
	MEB-7R	GAGAGATCTAAATGCCACCC	
	MEB-8F	TGCCTGGGGCTCTTCAAACC	60°C
	MEB-8R	CAGGTAGGGAAAGCCCAACC	
	MEB-9F	GTGGGGATCCAGTTTGAAGG	60°C
	MEB-9R	CTCAAGAGTTCTCCTGGAGG	
	MEB-10R	GCCCAGCTGTAAACACAGGG	60°C
	MEB-10F	CTGGCAATCACTGCTGCTCC	
MEB-11F	GCCTTGGATTGCAGAGGTGG	60°C	
MEB-11R	GTGGGAATAGGGCACATGAGC		
MEB-12F	GGCAGACACCTGGCTCTGCC	62°C	
MEB-12R	CCACGTAACAGGCCCCAGACC		
MEB-13F	TGCTGCCTGCAAGAAGAGGG	60°C	
MEB-13R	ACACCTCACTGACTCTTTCCC		
MEB-14F	CCCAGCTCCAGCAATCTTAGC	60°C	
MEB-14R	GGGAGGTATTAGCTGAGGCC		
MEB-15F	TGACCAGGGTTTAGCAGGCG	60°C	
MEB-15R	AGACATGGACCACGATGAAGG		
MEB-16F	TGGAGTCCCCTACCAACTCG	60°C	
MEB-16R	CTTGACTGTCATGCCCACTG		
MEB-17F	TCAGCAAGTGGGTGTGGGCC	60°C	
MEB-17R	GGGACTTTCAGGGACTGGCC		
MEB-18F	TGCCCTGCTCAGTGCTACCC	60°C	
MEB-18R	TAAATTATGGGGCCAAGATCCC		
MEB-19F	AGGGTCTGTGGGACACACC	60°C	
MEB-19R	GGGGCAGTATGTGTGTGAGG		
MEB-20F	CCAAAGGGTCGTCACTGACC	60°C	
MEB-20R	AAGCCATTAGCTATATCCCTGG		

	MEB-21F	GCCCTGGGAAACAGGAGGCC	60°C
	MEB-21R	GTAGGAGGGAAGGGCTAGCC	
LARGE	Large ex3F	GCCTTCCTCTTTGCTCTTCC	60°C
	Large ex3R	TCCCTCCTTCCCTCTCACTT	
	Large ex4aF	AGGCATGGTTCATCCAGATT	60°C
	Large ex4aR	GAGTAGGTCTTGGAGTGGTTGC	
	Large ex4bF	CGAGGTGGAGGAGGAGAAC	60°C
	Large ex4bR	AGGCTCCAGATGCCCTTTAC	
	Large ex5F	GATCTGAAGCACCAGGAAGG	60°C
	Large ex5R	TCCCCAAGGAAATACACAGG	
	Large ex6F	CCTGACCCCTTCCCTTCTCACA	60°C
	Large ex6R	TGGCATTGCTACAGTCTGCT	
	Large ex7F	TCCAACTCTCTCTCTGCCTTG	60°C
	Large ex7R	CCTACAAGGATATCGGGAAA	
	Large ex8F	TGGCTTGGCTTCTCCTTTTA	60°C
	Large ex8R	CCTGAGCTTTTGCAATCTCC	
	Large ex9F	GGTGTGCCTAGCTCTCCATC	60°C
	Large ex9R	TGAGAAACAGCACCAAGCAC	
	Large ex10F	CCTATCACAGGGGATGCAGT	60°C
	Large ex10R	AGGGATGTCCCTGTGTTGAC	
	Large ex11F	CCTGCCATACCTGACCACTT	60°C
	Large ex11R	TGATGGATGAGCAGAGAAGC	
	Large ex12F	CCCTCGGACCTCTTCTTCAC	60°C
	Large ex12R	GTGAGGCCGTCTGCCATA	
	Large ex13aF	ACCCTCCCTGTCTCTTCCAG	60°C
	Large ex13aR	TGTAGGGAGTGCTGATGTGC	
	Large ex13bF	TGTACAAGGAGGGCCAGTTC	60°C
	Large ex13bR	CCCCATCTGGAAAAGAAACC	
	Large ex14F	CCTGGTGTACAGGGACTCT	60°C
	Large ex14R	CCCCAGAGTACAGCAGCTA	
	Large ex15F	ATGGCTTTTCTCCGTGTGTC	60°C
	Large ex15R	GTGGATGCTCCGTTCTTCTC	
	Large ex16F	CGCTGCTCTTGTCTTCTTCC	60°C
	LARGE ex16R	GGGATTAGGGATTGCCACTT	
FKTN	FCMDp1bF	AGATTATAAAAGCGAGGAATCGC	55°C
	FCMDp1bR	TACCTGTCTGAAGGCGCC	
	FCMDp2aF	CTATTGTTGGTTATTACAGGTAC	55°C
	FCMDp2aR	CTTGTGAGCGTTAAAAGGGC	
	FCMDp2bF	TGAAAACGACTGAGATACTTTC	55°C
	FCMDp2bR	TGCAAAGAGAAGTGTGATCAGA	
	FCMDp3F	GTTGCATGCTGGACTTTGAA	55°C
	FCMDp3R	CATAAAGCACTTGGTAAAGGGC	
	FCMDp4aF	GACTGTTGTGTTGGCTTACTGG	55°C
	FCMDp4aR	GATACTGCAGTGCAAATGCAG	
	FCMDp4bF	CTTCTCATGGCTCTACTTCAC	55°C
	FCMDp4bR	TTTAAACTAGCCTAAACCTATAC	
	FCMDp5aF	AGTTTTGCTACTAGTATTTGGC	55°C

	FCMDp5aR	TGAAAGACTACCAAGTGGATC	
	FCMDp5bF	AGACTCACTCTCTGGAACCTG	55°C
	FCMDp5bR	GACTGAACAACACTCATTTCAC	
	FCMDp6F	TGTCTTAATGTTCTCCCTCC	55°C
	FCMDp6R	CCCTTCATCTTACCACCCCTC	
	FCMDp7F	TCAAATTTAATTCAGATGCCACA	55°C
	FCMDp7R	TCCCTAAAGCCAGAGGACAA	
	FCMDp8aF	GGTGAAGCATCTTAAGTCTAATCC	55°C
	FCMDp8aR	TTCTTAGGTCAACATCTTTGC	
	FCMDp8bF	TTTTAGGATGGTATCGACAATGC	55°C
	FCMDp8bR	ATTCTTAACCATATCTGAGTTGC	
	FCMDp9aF	GTGCATCTTAGAATGAATACTCT	55°C
	FCMDp9aR	TTCTTGTTTTGGCCTGAGTG	
	FCMDp9bF	TTGGAACTATCCTTCCAGGG	55°C
	FCMDp9bR	ACTTCTTTATTTCTACCTCCTG	
	FCMDp10F	CTTCTTCCACTGTTGAAGCC	55°C
	FCMDp10R	TTTTCCAAAAGAGAAATTTCTCC	

Conferma delle mutazioni

Se è stata trovata una variazione nucleotidica nel prodotto di PCR in esame, questa viene validata con una seconda metodica diversa dalla tecnica SSCP. Si utilizzano:

- a) l'analisi dei polimorfismi dei frammenti di restrizione, se la mutazione causa perdita o acquisizione di un sito di restrizione. Questo metodo consiste nel digerire con l'adeguato enzima di restrizione il prodotto di PCR di interesse. Si separano i frammenti di restrizione in gel d'agarosio e si fotografa il risultato con macchina Polaroid;
- b) se la variazione nucleotidica non modifica un sito di restrizione, si può utilizzare la tecnica tetra-primers ARMS PCR (Amplification Refractory Mutation System) che è basata sull'allestimento in multiplex di 2 reazioni di amplificazione con 4 primers specifici. Una coppia è un controllo di efficacia della PCR ed una coppia

viene disegnata in modo mutazione-specifico: un primer ha all'estremità 3' terminale una base normale e l'altro 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, a seconda del primer che viene amplificato (Ye et al., 2001).

Una volta confermata la variazione nucleotidica, se la mutazione è codificante si deve stabilire se si tratta di un polimorfismo o di una mutazione causativa. Per prima cosa si verifica se la variazione corrisponde ad una variazione di aminoacido. Se la mutazione è silente non viene ulteriormente perseguita. Si controlla l'eventuale presenza in letteratura della variazione utilizzando diversi database per stabilire se si tratta di un polimorfismo o di una mutazione noti. Per i polimorfismi si utilizza il database on-line Entrez - SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), per le mutazioni il Human Gene Mutation Database (HGMD) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) e il Leiden Muscular Dystrophy pages (LOVD) (<http://www.dmd.nl/>).

Una volta evidenziato che la variazione identificata non è un polimorfismo o una mutazione noti, si applicano diversi criteri per stabilirne la patogenicità:

- si analizza la frequenza della mutazione nella popolazione di controllo, che deve essere inferiore ad almeno l'1%. Per questo si utilizza un pannello di almeno 100 cromosomi di controllo;
- si valuta la segregazione della mutazione nella famiglia, quando possibile, che deve seguire le modalità di una trasmissione autosomica recessiva;

- si esamina la conservazione dell'aminoacido, nel caso di mutazioni missenso, nelle diverse specie.

Sono state considerate "a priori" patogenetiche le mutazioni nonsense, le inserzioni, le delezioni, con slittamento del quadro di lettura, le alterazioni dei siti di splicing.

RISULTATI

Popolazione dei pazienti studiati

Sono stati selezionati per lo studio dell' α -DG 234 pazienti. Di questi 146 erano affetti da LGMD, 38 da CMD e 50 da miopatia non altrimenti caratterizzata.

Studio immunostochimico con IIH6

Le biopsie muscolari dei 234 pazienti selezionati sono state testate con l'anticorpo IIH6 diretto contro un epitopo glicosilato dell' α -DG per studiare la glicosilazione della proteina ed identificarne difetti. Il 40% (94/234) delle biopsie muscolari dei pazienti analizzati presentava un deficit di glicosilazione dell' α -DG (Tabella 3). Il 34% (79/234) presentava un deficit parziale di glicosilazione, mentre il 6% (15/234) mostrava un deficit totale (Figura 5). In 20 pazienti con difetto di glicosilazione di α -DG, la biopsia muscolare è stata analizzata anche con un anticorpo diretto contro il core peptidico della proteina. Come atteso, tutte le biopsie presentavano normale espressione di α -DG (Figura 6).

Analizzando il difetto di glicosilazione rispetto al fenotipo clinico dei pazienti studiati, si evidenzia che: 57/146 (39%) pazienti selezionati con fenotipo tipo LGMD, 19/38 (50%) dei pazienti selezionati con fenotipo CMD e 18/32 (56%) dei pazienti con miopatia non altrimenti determinata, mostravano ridotta glicosilazione dell' α -DG. Il 60% (140/234) delle biopsie muscolari analizzate mostrava una normale glicosilazione dell' α -DG.

Tabella 3. Dati immunostochimici per IIH6 nella coorte di pazienti

	Normale	Deficit parziale	Deficit totale	TOT
LGMD	89	49	8	146
CMD	19	13	6	38
Miopatia	32	17	1	50
TOT	140	79	15	234

Studio di immunoblot con IIH6

L'immunoblot con l'anticorpo IIH6 è stato eseguito su 47 campioni risultati deficitari di α -DG in immunostochimica al fine di quantificarne il difetto di glicosilazione. Il muscolo di controllo presentava una estesa banda in corrispondenza del peso molecolare atteso di 156 kDa.

Tredici pazienti mostravano un deficit totale di α -DG glicosilato (13/47, 28%), 8 pazienti mostravano una riduzione compresa tra 5 e 20% dei controlli (8/47, 17%), 10 pazienti una riduzione tra il 20 e il 50% (10/47, 21%), 8 pazienti tra il 50 e 80% (8/47, 17%) e 2 pazienti tra 80 e 100% (2/47, 4%). In 6 pazienti non si è osservata una riduzione di α -DG (6/47, 13%) (Tabella 4) (Figura 7).

Tabella 4. Dati di immunoblot per IIH6 nella coorte di pazienti

Difetto di glicosilazione di α -DG in %	0	>0 – ≤20	>20 – ≤50	>50 – ≤80	>80 – <100	100

Numerosità dei pazienti (Totale 47)	13	8	10	8	2	6
--	----	---	----	---	---	---

Studio di mutazione dei geni *FKRP*, *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *FKTN* e *LARGE*

L'analisi di mutazione per i geni *FKRP*, *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *FKTN* e *LARGE* è stata condotta sui 94 pazienti in cui è stato identificato un difetto di glicosilazione dell' α -DG. In 29 probandi (29/94, 31%) sono state identificate mutazioni in omozigosi o eterozigosi composta. Sono state identificate 20 mutazioni diverse di cui 7 non previamente riportate in letteratura. Complessivamente sono state identificate 13 mutazioni missenso, 2 mutazioni nonsense, 3 mutazioni di siti di splicing e 2 inserzioni con slittamento del quadro di lettura (Tabella 5). Su un totale di 20 mutazioni identificate, 5 sono ricorrenti: nel gene *FKRP* la mutazione Leu276Ile è stata identificata in 8 pazienti, la mutazione Arg143Ser in 5 pazienti, la mutazione Pro358Leu in 3 pazienti e la mutazione Pro426Ser in 2 pazienti; nel gene *POMT2* la mutazione Gly353Ser è stata identificata in 2 pazienti. In totale sono stati identificati 47 alleli mutati su 58 (47/58, 81%).

Gene *FKRP*: sono state identificate 6 mutazioni in 16 pazienti (Tabella 5). In 12 pazienti sono stati identificati entrambi gli alleli mutati ed in 4 pazienti solo uno. Tutte le mutazioni sono state del tipo missenso e localizzate nel dominio intraluminale della proteina. Le mutazioni sono risultate distribuite lungo l'intera sequenza codificante di *FKRP* senza raggruppamenti significativi (Figura 8). La mutazione C826A è stata riscontrata in 15 su 32 alleli mutati (47%) (Figura 9).

Sono stati identificati 7 polimorfismi, 5 erano polimorfismi silenti C135T (Ala45Ala), A201G (Val67Val), T1164C (Asp388Asp), C1242T (Hys414Hys), C1405T (Leu469Leu), ed uno si localizzava nella regione 5' non tradotta (-34C>T). La variazione nucleotidica C341G, presente in 2 pazienti, risultava nella sostituzione di una alanina con una glicina (Ala114Gly). Questa variazione C341G ha mostrato una frequenza dell'1% nella popolazione di controllo (una variazione su 1/100 cromosomi studiati) (Tabella 7).

Tutti i pazienti identificati con mutazioni del gene *FKRP* (LGMD2I) presentavano un normale profilo cognitivo ed avevano una RMN cerebrale normale. Tredici pazienti presentavano un fenotipo tipo cingoli con età di esordio del deficit di forza variabile tra i 2 ed i 50 anni; 3 pazienti presentavano un fenotipo clinico mite: un paziente presentava iperCKemia e mialgie (paziente 2), un paziente aveva una miopatia lieve tardiva (paziente 10) ed un paziente presentava mialgie con iperCKemia fluttuante (paziente 16).

Gene *POMT1*: sono state identificate 9 mutazioni in 8 pazienti di cui 6 non note in letteratura (Tabella 5). In 4 pazienti sono stati identificati entrambi gli alleli mutati, mentre in 4 pazienti è stato identificato un solo allele. Sono state identificate 2 inserzioni con slittamento del quadro di lettura, 2 mutazioni nonsense, 1 mutazione nel sito donatore di splicing e 4 mutazioni missenso. Delle 4 mutazioni missenso, la mutazione Asn144Asp è localizzata nel dominio conservato protein-mannosil transferasico (PMT), la mutazione Thr414Met nel dominio MIR (dominio del recettore trifosfato della rianodina ed inositolo e proteina *O*-mannosil transferasi) intraluminale nel reticolo endoplasmico sede dell'attività catalitica (Figura 10), le mutazioni Arg735Cys e Gln590His sono entrambe localizzate nel dominio intraluminale della proteina (Figura 11). Queste mutazioni sono risultate assenti in

100 cromosomi di controllo e coinvolgono aminoacidi conservati durante l'evoluzione (Tabella 6). Le mutazioni nonsense, Tyr515X e Arg622X, e le due inserzioni con slittamento del quadro di lettura, Ala704GlyfsX27 e Val417CysfsX17, predicono una proteina tronca. La mutazione Tyr515X si colloca nel dominio intraluminale, la Arg622X nel dominio citoplasmatico, la Val417CysfsX17 nel dominio MIR e la Ala704GlyfsX27 nel dominio transmembrana (Figura 11). La mutazione del sito di splicing IVS4 +1G>T, che coinvolge il nucleotide conservato in posizione +1 del sito donatore di splicing, predice lo splicing alternativo, con conservazione del quadro di lettura, dell'esone 4. Gli aminoacidi (dal residuo 77 al residuo 94) codificati dall'esone 4 si collocano nel dominio PMT della proteina. Non è stato possibile lo studio dell'espressione del trascritto alternativo codificato da questa mutazione di splicing in quanto non era disponibile il tessuto muscolare per l'estrazione dell'RNA.

Sono stati identificati 11 polimorfismi, di cui 4 erano polimorfismi silenti, C1113T (Asp371Asp), C1191T (His397His), C1764T (Ser588Ser), C942T (Thr314Thr). Tre erano codificanti, G1565A (Arg522Lys), C751T (Arg251Trp) e G752A (Arg251Gln) e 4 si localizzavano nelle regioni introniche (IVS12+34G>A, IVS15+14G>A, IVS17-14C>T, IVS19+13C>T) (Tabella 7).

Tre dei pazienti con mutazioni del gene *POMT1* erano affetti da CMD, gli altri 5 da una forma cingolare di distrofia muscolare. Il paziente 23 presentava un fenotipo tipo WWS con alla RMN cerebrale un quadro caratterizzato da lissencefalia, idrocefalo, agenesia del corpo calloso e dei bulbi olfattori, ipoplasia cerebellare. Aveva anche glaucoma, atrofia retinica e cataratta. Il paziente 22 presentava un fenotipo MEB con alla RMN displasia corticale e idrocefalo. Il paziente 24 presentava un fenotipo tipo CMD con ritardo mentale e dalla RMN cerebrale mostrava idrocefalo senza alterazioni strutturali di rilievo. I 5 pazienti con fenotipo

tipo LGMD hanno avuto un esordio di malattia in età comprese fra i 4 ed i 35 anni di età. In tutti si è trattato di un deficit di forza prevalente al cingolo pelvico con ipertrofia dei polpacci ed ipotrofia relativa del cingolo scapolare. In due pazienti era presente cardiomiopatia dilatativa di grado severo (pazienti 17 e 19).

Gene *POMT2*: sono state identificate 3 mutazioni in 3 pazienti. Solo in un paziente sono stati identificati entrambi gli alleli mutati. Sono state identificate 2 mutazioni missenso ed una mutazione di splicing (Tabella 5). La mutazione Gly353Ser e la mutazione Arg434Trp si localizzano nel dominio MIR della proteina (Figura 12). La sostituzione nucleotidica in posizione -6 del sito accettore di splicing dell'introne 12 causa la creazione di un sito di splicing criptico 5 nucleotidi prima del sito canonico. L'utilizzo di un programma di calcolo per i siti di splicing che impiega le matrici compilate da Shapiro e Senapathy (Shapiro et al., 1987) mostrava un valore del sito di splicing canonico di 83.2, mentre quando è stata analizzata la sequenza mutata il sito di splicing è stato identificato 5 nucleotidi prima con un punteggio di 88.1. Sfortunatamente la biopsia muscolare di questa paziente non era disponibile per l'estrazione dell'RNA e la valutazione dei trascritti alternativi, tuttavia la simulazione al computer predice l'inserzione di 5 paia di basi nell'esone 13 con lo slittamento del quadro di lettura e l'inserzione di un codone di stop prematuro. La glicina in posizione 353 e l'arginina in posizione 434 sono conservate nell'evoluzione.

Sono stati identificati 5 polimorfismi, 1 polimorfismo silente G355T (Tyr119Tyr) ed uno codificante C161A (Ala54Glu) e 3 si localizzavano nelle regioni introniche (IVS6-18G>A, IVS17+44C>T, IVS17+54C>T) (Tabella 7).

Il paziente 25 presentava un fenotipo clinico compatibile con una forma di CMD con ritardo mentale. La RMN cerebrale mostrava una ipoplasia cerebellare con

ponte sottile ed un modesto idrocefalo. Il paziente 26 presentava una miopatia lieve con mialgie ricorrenti, mentre il paziente 27 una CMD con ritardo mentale.

Gene *POMGnT1*: sono state identificate 2 mutazioni in 2 pazienti (Tabella 5). Un paziente presentava in omozigosi la mutazione IVS15-2A>G ed il secondo paziente in eterozigosi la mutazione Asp556Asn (la mutazione del secondo allele mutato non è stata identificata). La mutazione del sito di splicing IVS15-2A>G, che coinvolge il nucleotide conservato in posizione -2 del sito accettore di splicing, predice lo splicing alternativo dell'esone 16. Anche per questo paziente non era disponibile la biopsia muscolare per poter effettuare l'estrazione dell'RNA e l'analisi dei trascritti. La mutazione è risultata assente in 250 cromosomi di controllo (Diesen et al., 2004). La mutazione missenso Asp556Asn si localizza nel dominio specifico per il substrato della proteina. Questa mutazione è assente in 100 cromosomi di controllo.

Sono stati identificati 3 polimorfismi, che si localizzavano nelle regioni introniche (IVS3+33T>G, IVS6+45A>G, IVS15-33C>T) (Tabella 7).

Il paziente 28 presentava un fenotipo tipo MEB con alla RMN cerebrale cisti cerebellari, fusione dei collicoli, lieve atrofia cerebrale e cerebellare, ipotrofia del tronco encefalico, e lieve alterazione della sostanza bianca; il paziente 29 aveva un fenotipo LGMD senza ritardo mentale.

Gene *FKTN*: non sono state identificate mutazioni causative in questo gene. Sono stati identificati 5 polimorfismi. Tre erano codificanti A1336G (Asn446Asp), G373A (Gly125Ser) e G608A (Arg203Gln) e 2 si localizzavano nelle regioni introniche (IVS6+14G>A, IVS9+17G>A) (Tabella 7).

Gene *LARGE*: non sono state identificate mutazioni causative in questo gene. Sono stati identificati 5 polimorfismi. Quattro erano polimorfismi silenti, C1092T (Thr364Thr), C2100T (Asn699Asn), C576T (Pro192Pro), G165C (Thr55Thr), ed 1 si localizzava nella regione intronica (IVS13+67A>G) (Tabella 7).

Tabella 5. Mutazioni identificate nei geni *FKRP*, *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *FKTN*, *LARGE*

paziente	fenotipo	Gene	variazione genomica	variazione proteica	Esone/ introne		IIH6 IHC	IIH6 WB (%)
1	LGMD	<i>FKRP</i>	C826A	Leu276Ile	4	Eterozigote composto	-	0
			C1384T	Pro426Ser	4			
2	miopatia	<i>FKRP</i>	C427A	Arg143Ser	4	Eterozigote composto*	+/-	60
3	LGMD	<i>FKRP</i>	C826A	Leu276Ile	4	Omozigote	+/-	0
4	LGMD	<i>FKRP</i>	C1073T	Pro358Leu	4	Eterozigote composto	-	0
			C1384T	Pro426Ser	4			
5	LGMD	<i>FKRP</i>	C427A	Arg143Ser	4	Eterozigote composto*	+/-	80
6	LGMD	<i>FKRP</i>	C427A	Arg143Ser	4	Eterozigote composto*	+/-	n.d.
7	LGMD	<i>FKRP</i>	C826A	Leu276Ile	4	Omozigote	+/-	0
8	LGMD	<i>FKRP</i>	C826A	Leu276Ile	4	Omozigote	+/-	30
9	LGMD	<i>FKRP</i>	C427A	Arg143Ser	4	Eterozigote composto*	+/-	n.d.
10	miopatia	<i>FKRP</i>	G731A	Arg244His	4	Omozigote	+/-	80
11	LGMD	<i>FKRP</i>	G478T	Val160Phe	4	Eterozigote composto	+/-	0
			C1073T	Pro358Leu	4			
12	LGMD	<i>FKRP</i>	C826A	Leu276Ile	4	Omozigote	+/-	60
13	LGMD	<i>FKRP</i>	C427A	Arg143Ser	4	Eterozigote composto	+/-	n.d.
			C1073T	Pro358Leu	4			
14	LGMD	<i>FKRP</i>	C826A	Leu276Ile	4	Omozigote	+/-	n.d.
15	LGMD	<i>FKRP</i>	C826A	Leu276Ile	4	Omozigote	-	0
16	miopatia	<i>FKRP</i>	C826A	Leu276Ile	4	Omozigote	-	0
17#	LGMD	<i>POMT1</i>	A430G	Asn144Asp	6	Eterozigote composto	+/-	n.d.
			C1241T	Thr414Met	12			
18#	LGMD	<i>POMT1</i>	C1545T	Tyr515X	15	Eterozigote composto*	+/-	15
19#	LGMD	<i>POMT1</i>	C1864T	Arg622X	18	Eterozigote composto*	+/-	60

20	LGMD	<i>POMT1</i>	C2203T	Arg735Cys	20	Eterozigote composto*	+/-	n.d.
21	LGMD	<i>POMT1</i>	G1770C	Gln590His	18	Eterozigote composto*	-	0
22	CMD	<i>POMT1</i>	2111insG	Ala704GlyfsX27	20	Omozigote	-	0
23#	CMD	<i>POMT1</i>	1249insT	Val417CysfsX17	13	Omozigote	-	0
24#	CMD	<i>POMT1</i>	IVS4+1G>T	Splicing	4	Omozigote	-	n.d.
25	CMD	<i>POMT2</i>	G1058A	Gly353Ser	9	Eterozigote composto	-	n.d.
			IVS12-6T>G	Splicing	12			
26#	miopatia	<i>POMT2</i>	C1300T	Arg434Trp	12	Eterozigote composto*	+/-	80
27	CMD	<i>POMT2</i>	G1058A	Gly353Ser	9	Eterozigote composto*	-	0
28	CMD	<i>POMGnT1</i>	IVS15-2A>G	Splicing	15	Omozigote	-	0
29	LGMD	<i>POMGnT1</i>	G1666A	Asp556Asn	20	Eterozigote composto*	+/-	n.d.

Il simbolo * indica che la seconda mutazione non è stata determinata. Il simbolo # indica mutazioni non presenti in letteratura. La sigla n.d. indica dato non disponibile. L'immunoistochimica per α -DG è stata quantificata in 3 classi: -: totale assenza; +/-: difetto parziale; +: normale α -DG.

Tabella 6. Allineamento multiplo delle proteine POMT1

SPECIE	REFERENZA	RESIDUO AMINOACIDICHE			
		<i>N144D</i>	<i>T414M</i>	<i>Q590H</i>	<i>R735C</i>
<i>Homo sapiens</i>	NP_009102.3	IENAL	LNTHD	SAQIH	ALRWK
<i>Bos taurus</i>	NP_001073799.1	IENAL	LNTHD	SAQIH	ALRWK
<i>Mus musculus</i>	AAS76201.1	IENAL	LNTHD	SAQIH	ALRWK
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_445858.1	IENAL	LNTHD	SAQIH	DLRWK
<i>Gallus gallus</i>	NP_001025856.1	LENSL	LNTHD	GAQIH	DLRWK
<i>Xenopus tropicalis</i>	AAH75534.1	FENAL	LNTHD	TAQIQ	SLRWK
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	CAF89480.1	LENSL	LNSHD	NAQIH	RLRWR
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_524025.2	LDNSL	LNSHD	SAQIY	SLRWK
<i>Neurospora crassa</i>	XP_332024.1	LDNAH	LLSHD	RQQIY	RRKWL
<i>Aspergillus nidulans</i>	XP_659063.1	FDNAH	LLTHD	REQIY	ARKWL
<i>Gibberella zeae</i>	XP_380784.1	LDNAH	LLSHD	RQQIY	RRKWL
<i>Hypocrea jecorina</i>	AAP05785.1	LDNAH	LLSHD	RQQIY	RKKWL
<i>Ustilago maydis</i>	XP_761580.1	FDNAH	LLTHD	QHQIY	ARRLL
<i>Yarrowia lipolytica</i>	XP_503607.1	LDNAH	LLTHD	RAQIY	WRQWM
<i>Ashbya gossypii</i>	NP_982862.1	VDNAH	LLTHD	RRQIY	KRQWF
<i>Kluyveromyces lactis</i>	XP_451701.1	VDNAH	LLAHD	RKQIF	ARQWF
<i>Candida glabrata</i>	XP_449354.1	IDNAH	LLAHD	RKQIY	KRKWL
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NP_596807.1	FDNAH	LMTHD	NKQIY	RRKWL
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_012677.1	IDTAH	LLAHD	KKQIY	SREWF

In tabella è mostrata la conservazione tra i diversi organismi dell'aminoacido mutato per le seguenti mutazioni N144D, T414M, Q590H, R735C.

Tabella 7. Polimorfismi identificati

Variazione nucleotidica	Variazione aminoacidica	Database on line
Gene <i>FKRP</i>		
5'UTR -34C>T		LOVD

C135T	Ala45Ala	LOVD
A201G	Val67Val	LOVD
C341G	Ala114Gly	LOVD
T1164C	Asp388Asp	LOVD
C1242T	Hys414Hys	LOVD
C1405T	Leu469Leu	LOVD
Gene <i>POMT1</i>		
C751T	Arg251Trp	Entrez-SNP rs3887873
G752A	Arg251Gln	Entrez-SNP rs2296949
C942T	Thr314Thr	Entrez-SNP rs10901065
C1113T	Asp371Asp	Entrez-SNP rs58348639
C1191T	His397His	Entrez-SNP rs35242383
G1565A	Arg522Lys	LOVD
C1764T	Ser588Ser	Nuova variazione
IVS12+34G>A		Nuova variazione
IVS15+14G>A		Nuova variazione
IVS17-14C>T		Nuova variazione
IVS19+13C>T		Entrez-SNP rs4740165
Gene <i>POMT2</i>		
C161A	Ala54Glu	LOVD
G355T	Tyr119Tyr	Nuova variazione
IVS6-18G>A		Nuova variazione
IVS17+44C>T		Nuova variazione
IVS17+54C>T		Nuova variazione
Gene <i>POMGnT1</i>		
IVS3+33T>G		LOVD
IVS6+45A>G		Nuova variazione
IVS15-33C>T		Nuova variazione
Gene <i>FKTN</i>		
G373A	Gly125Ser	LOVD
G608A	Arg203Gln	LOVD
A1336G	Asn446Asp	LOVD
IVS6+14G>A		Nuova variazione
IVS9+17G>A		Nuova variazione
Gene <i>LARGE</i>		
G165C	Thr55Thr	Nuova variazione
C576T	Pro192Pro	Nuova variazione
C1092T	Thr364Thr	LOVD
C2100T	Asn699Asn	LOVD
IVS13+67A>G		Nuova variazione

In tabella sono indicate le referenze quando disponibili.

LOVD = Leiden Muscular Dystrophy pages (www.dmd.nl)

Entrez - SNP = (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>)

Studio dell' α -distroglicano nei pazienti mutati nelle varie glicosiltransferasi

In conclusione in relazione al fenotipo sono state identificate mutazioni causative:

- nei geni *FKRP*, *POMT1* e *POMGnT1* in 19 pazienti con fenotipo clinico tipo LGMD (19/57; 33%);
- nei geni *POMT1*, *POMT2* e *POMGnT1* in 6 pazienti con fenotipo CMD (6/18; 33%);
- nei geni *FKRP* e *POMT2* in 4 pazienti con miopia (4/19; 21%) (Tabella 8).

Tabella 8. Percentuale di mutazione nelle varie glicosiltransferasi nei pazienti con difetto di glicosilazione dell' α -DG

	Deficit di α -DG	Mutazioni in glicosiltransferasi	Percentuale
LGMD	57	19	33% (19/57)
CMD	18	6	33% (6/18)
miopia	18	4	21% (4/19)

Nei pazienti mutati si è osservata completa assenza di glicosilazione di α -distroglicano in 4 pazienti affetti da LGMD, in 6 pazienti affetti da CMD e 1 paziente affetto da miopia. Difetti parziali sono stati osservati in 15 pazienti affetti da LGMD, 3 pazienti affetti da miopatie ed in nessun paziente affetto da CMD (Tabella 9).

Tabella 9. Difetto di glicosilazione nei pazienti mutati

	Deficit totale di α -DG	Deficit parziale di α -DG
LGMD	4	15
CMD	6	0
Miopatia	1	3

DISCUSSIONE

Le distroglicanopatie costituiscono un gruppo relativamente recente di malattie neuromuscolari caratterizzate da un estremo polimorfismo clinico, ma accumulate da una ridotta glicosilazione dell' α -DG nelle biopsie muscolari dovuta a mutazioni in 6 geni codificanti glicosiltransferasi certe o putative. In questo lavoro abbiamo sistematicamente scrinato una coorte di pazienti con diagnosi di CMD o LGMD o miopatia ad eziopatogenesi sconosciuta per mutazioni nei geni *FKRP*, *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *FKTN*, e *LARGE*. I pazienti sono stati selezionati sulla base del riscontro di una ridotta glicosilazione di α -DG nella loro biopsia muscolare. Nelle distrofie muscolari/miopatie ad eziopatogenesi sconosciuta il tasso di identificazione di difetti di glicosilazione è stato del 40%, ma solo nel 31% di questi casi è stato possibile identificare una mutazione in una glicosiltransferasi. La discrepanza fra l'elevato numero di pazienti con difetti di glicosilazione ed il numero di pazienti identificati con mutazioni causative nelle glicosiltransferasi note suggerisce che vi siano altri geni, attualmente sconosciuti, coinvolti nella glicosilazione dell' α -DG. Questa ipotesi è verosimile considerato che nei lieviti, organismi nei quali la *O*-glicosilazione è stata più ampiamente studiata, la *O*-glicosilazione stessa è un processo multifasico nel quale intervengono in sequenza numerose glicosiltransferasi appartenenti ad una famiglia di PMT (protein *O*-mannosyltransferase) molto numerosa e molto conservata nella evoluzione, tanto che si ritiene che le prime fasi della glicosilazione siano in comune negli eucarioti e nei lieviti (Willer et al., 2003). Alternativamente il basso tasso di mutazione osservato può essere dovuto alla incompleta sensibilità della tecnica di indagine di mutazione da noi utilizzata. È noto infatti che la tecnica di SSCP ha una sensibilità variabile tra il 60% ed il 90% nelle varie casistiche, tuttavia riteniamo che le condizioni di SSCP da noi utilizzate garantiscano almeno l'80% di identificazione delle mutazioni. Nei pazienti mutati sono stati identificati infatti l'81% degli alleli mutati (47/58). Inoltre in diversi casi in cui i prodotti di PCR sono stati anche direttamente

sequenziati al sequenziatore automatico, i risultati hanno confermato i dati di SSCP. Un'altra ragione per giustificare, almeno in piccola parte, il basso tasso di mutazione è che nella nostra analisi di mutazione non sono state incluse le regioni introniche non codificanti dei geni che potrebbero essere sede di rari eventi mutazionali.

Nei pazienti con totale assenza di glicosilazione di α -DG, come atteso, il tasso di mutazioni identificate è stato superiore, arrivando al 73%, rispetto ai pazienti con difetti parziali dove è stato solo del 23%. Questo è dovuto probabilmente ai nostri criteri di inclusione dei pazienti nello screening. Infatti nel gruppo di difetti parziali di glicosilazione sono compresi sia pazienti con espressione notevolmente ridotta che pazienti con una modesta o sfumata riduzione della glicosilazione di α -DG all'indagine immunostochimica su biopsia muscolare. Probabilmente in questo ultimo gruppo di pazienti si collocano anche dei falsi positivi come suggerito dal riscontro di un normale pattern di glicosilazione all'immunoblot in 6 pazienti nei quali era stato identificato un difetto in immunostochimica. Questo criterio permissivo è stato adottato nel tentativo di evitare di escludere dallo screening pazienti potenzialmente mutati con difetti biochimici molto modesti.

Stratificando i pazienti sulla base del loro fenotipo clinico abbiamo riscontrato un tasso di mutazione simile nelle LGMD (33%) e nelle CMD (33%), mentre sono state riscontrate mutazioni solo nel 21% dei pazienti affetti da miopatia non altrimenti determinata, ma con caratteristiche cliniche suggestive di distroglicanopatia. Il minor tasso di mutazioni osservato nel gruppo delle miopatie è probabilmente legato alla grande eterogeneità genetica e clinica di questo gruppo di pazienti. Il tasso di mutazione osservato nelle LGMD è più elevato di quello precedentemente riportato in letteratura (4%; Godfrey et al., 2007) e questo è verosimilmente in relazione al fatto che nel lavoro di Godfrey e collaboratori erano stati esclusi i pazienti affetti da LGMD2I che rappresenta una causa relativamente comune di LGMD. Nelle CMD abbiamo invece

osservato un tasso di mutazione inferiore alle stime precedentemente riportate, anche in questo caso imputabile alla differente popolazione studiata. Nel nostro gruppo di CMD abbiamo incluso non solo CMD con alterazioni strutturali del SNC, nei quali è più alto il sospetto clinico di distroglicanopatie e più verosimile l'identificazione di mutazioni, ma anche pazienti con CMD senza coinvolgimento di altri organi.

Le mutazioni nel gene *FKRP* sono state le mutazioni più frequentemente identificate, seguite da mutazioni nel gene *POMT1*, *POMT2* e *POMGnT1*. Non abbiamo identificato mutazioni nei geni *FTKN* e *LARGE*. Tutte le mutazioni identificate nei vari geni si collocano in domini funzionalmente rilevanti della diverse proteine e, per quanto riguarda le mutazioni missenso, coinvolgono residui evolutivamente conservati. In questo lavoro non abbiamo evidenziato una stretta correlazione tra il tipo e la posizione della variazione nucleotidica ed il fenotipo clinico risultante. Tuttavia, le mutazioni che danno luogo ai difetti proteici più gravi (mutazioni con slittamento del quadro di lettura e proteine tronche, o mutazioni nei siti di splicing) si sono associate ai fenotipi più severi come nei casi delle mutazioni nel gene *POMT1* associate a fenotipo clinico tipo WWS o MEB, mentre le mutazioni missenso verosimilmente associate ad una residua funzionalità proteica a fenotipi più miti. Questo dato suggerisce la possibilità di derivare, attraverso il dosaggio dell'attività della corrispondente glicosiltransferasi in cellule umane o attraverso la valutazione dell'entità funzionale del difetto di glicosilazione, dati predittivi della severità del fenotipo.

Un risultato rilevante di questo lavoro è stata l'espansione dello spettro fenotipico legato alle mutazioni del gene *POMT1*. Sebbene le glicosiltransferasi, ed in particolare la *POMT1*, siano espresse ad elevato livello nel muscolo cardiaco, il coinvolgimento cardiaco sotto forma di cardiomiopatia dilatativa è stato riportato solo in pazienti con mutazioni nei geni *FKRP* e *FTKN*. Noi abbiamo identificato due pazienti con mutazioni del gene *POMT1* e cardiomiopatia dilatativa severa (pazienti 17 e 19). Il

paziente 17 era un eterozigote composto per due diverse mutazioni missenso, mentre il paziente 19 un eterozigote composto per una mutazione nonsense nel quale non siamo riusciti ad identificare la mutazione del secondo allele. È difficile speculare sul perchè questo fenotipo non sia stato precedentemente identificato nei pazienti con mutazioni del gene *POMT1*. È possibile che, almeno in parte, questo sia dovuto al fatto che mutazioni in questo gene si associano a fenotipi severi con precoce mortalità e mancata acquisizione delle tappe motorie, in particolare la deambulazione autonoma. Nei pazienti con fenotipi più miti l'esercizio muscolare può accelerare la degenerazione del muscolo cardiaco e portare alla cardiopatia dilatativa, infatti entrambi i pazienti presentavano un fenotipo LGMD con una ridotta compromissione muscolare. Un'altra possibilità è che le mutazioni identificate in questi pazienti, non precedentemente riportate in letteratura, possano modificare più di altre la glicosilazione dell' α -DG cardiaco rendendo il muscolo cardiaco pronò alla degenerazione. È infatti noto che il DG presenta diversi pattern di glicosilazione nei diversi tessuti, come dimostrato dai differenti pesi molecolari della proteina nel muscolo scheletrico e muscolo cardiaco. Il riscontro di cardiomiopatia nei pazienti con mutazioni in *POMT1* è molto rilevante clinicamente perchè suggerisce in tutti i pazienti affetti da distroglicanopatia uno stretto monitoraggio della funzionalità cardiaca.

In conclusione in questo lavoro si conferma l'estrema eterogeneità fenotipica delle diverse distroglicanopatie. L'ampio spettro fenotipico, che include forme congenite e con perturbazione dello sviluppo neuronale e forme più tardive, sottolinea l'importanza cruciale delle glicosiltransferasi nello sviluppo embrionale come già suggerito dagli studi su modelli animali con inattivazione del gene *Pomt1* (Willer et al., 2004, Prados et al., 2007).

L'esistenza di pazienti con difetti di glicosilazione ed assenza di mutazione nelle glicosiltransferasi note sottolinea l'ulteriore eterogeneità genetica di questa condizione e rappresenta il punto di partenza per sviluppi e studi futuri.

FIGURE

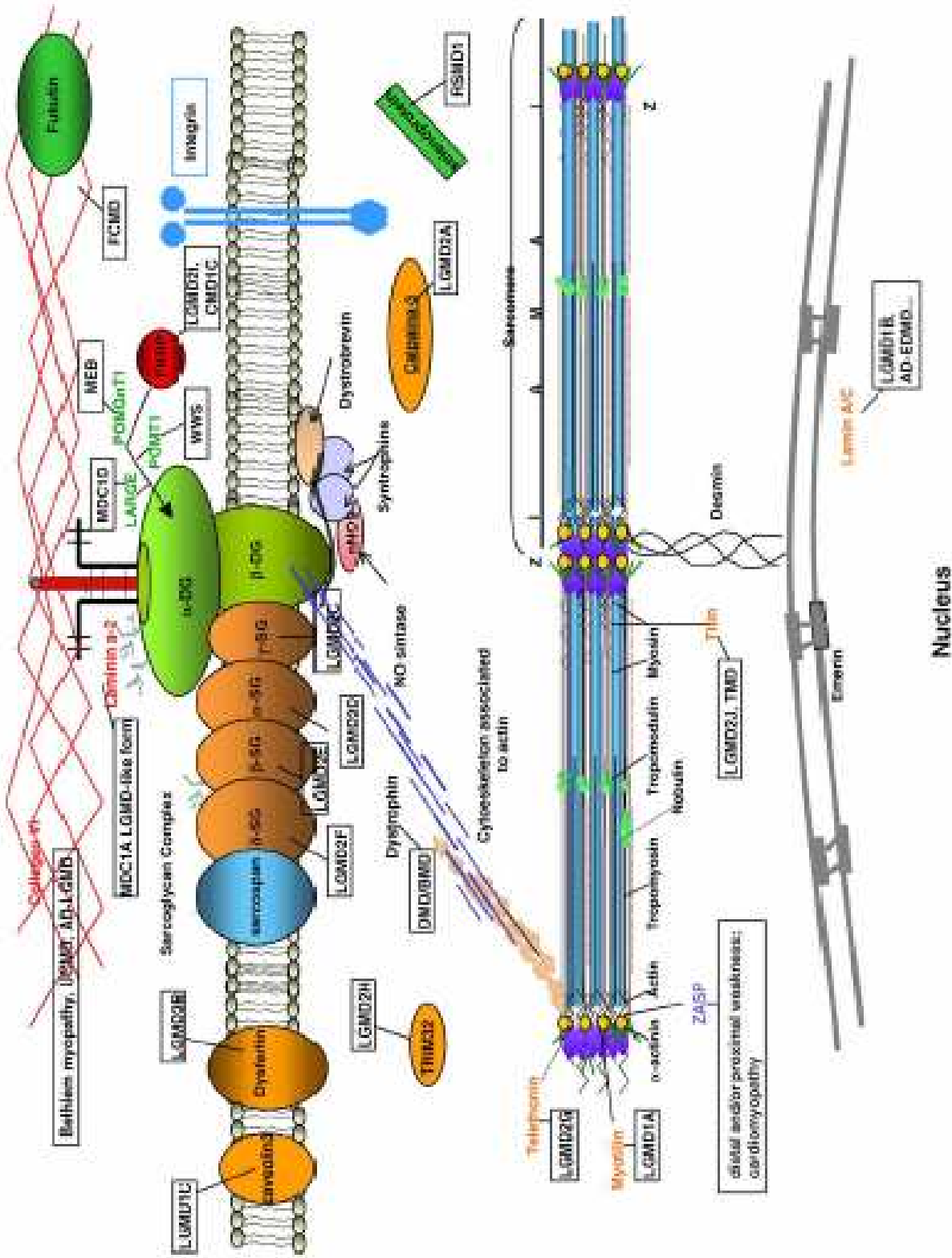
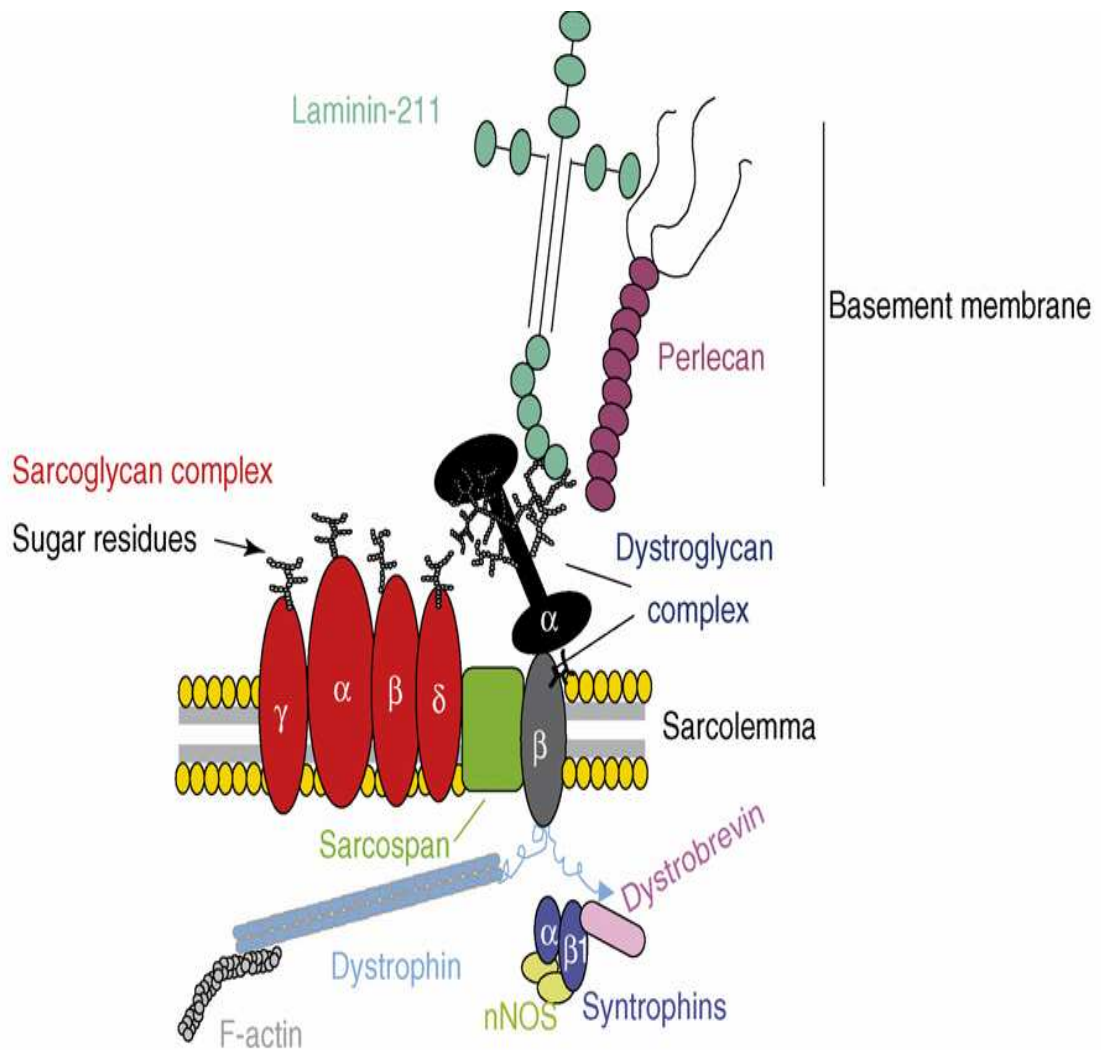


Figura 1. Schema dell' organizzazione delle proteine di membrana e del citoscheletro delle fibre muscolari (Guglieri et al., 2005).



TRENDS in Biotechnology

Figura 2. Complesso multimerico DGC (dystrophin-associated glycoprotein complex).

Al centro è visibile il complesso del distroglicano (α e β distroglicano) (Sciandra et al., 2007).

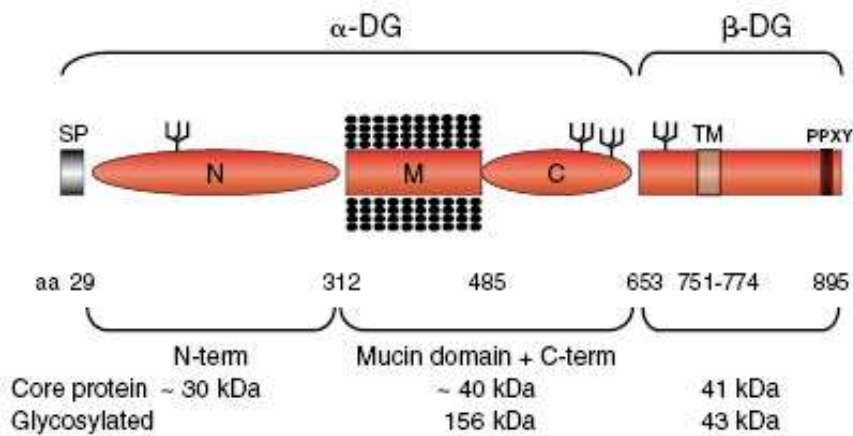


Figura 3. Organizzazione dei domini del distroglicano.

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).

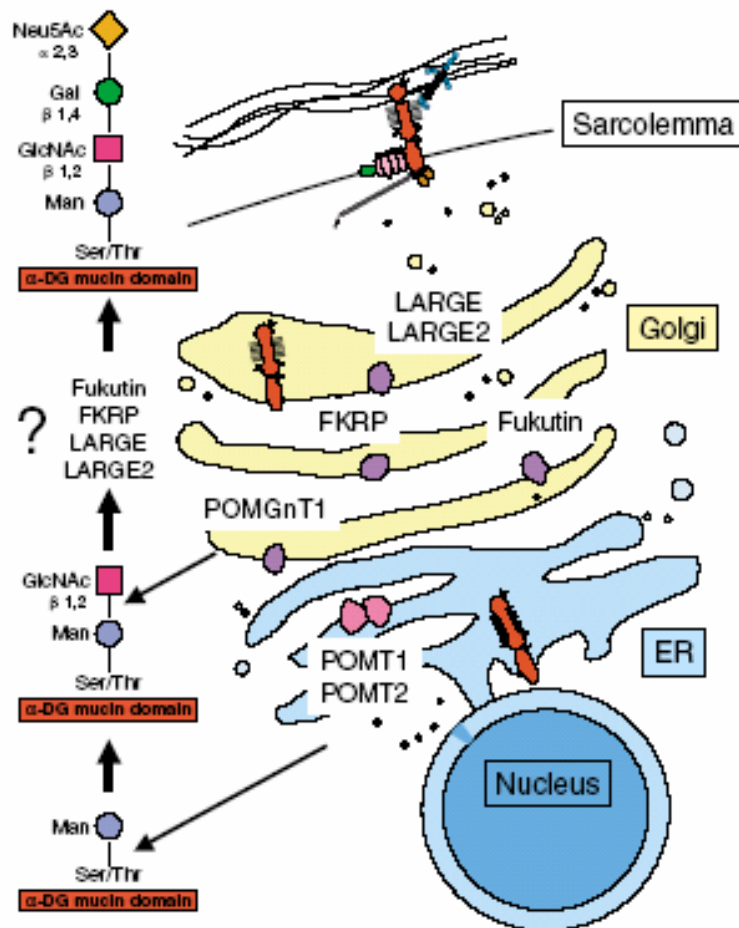


Figura 4. Glicosilazione dell' α -dystroglicano.

Sono indicate le localizzazioni delle glicosiltransferasi coinvolte nella *O*-glicosilazione dell' α -DG all'interno della cellula (Barresi et al., 2005).

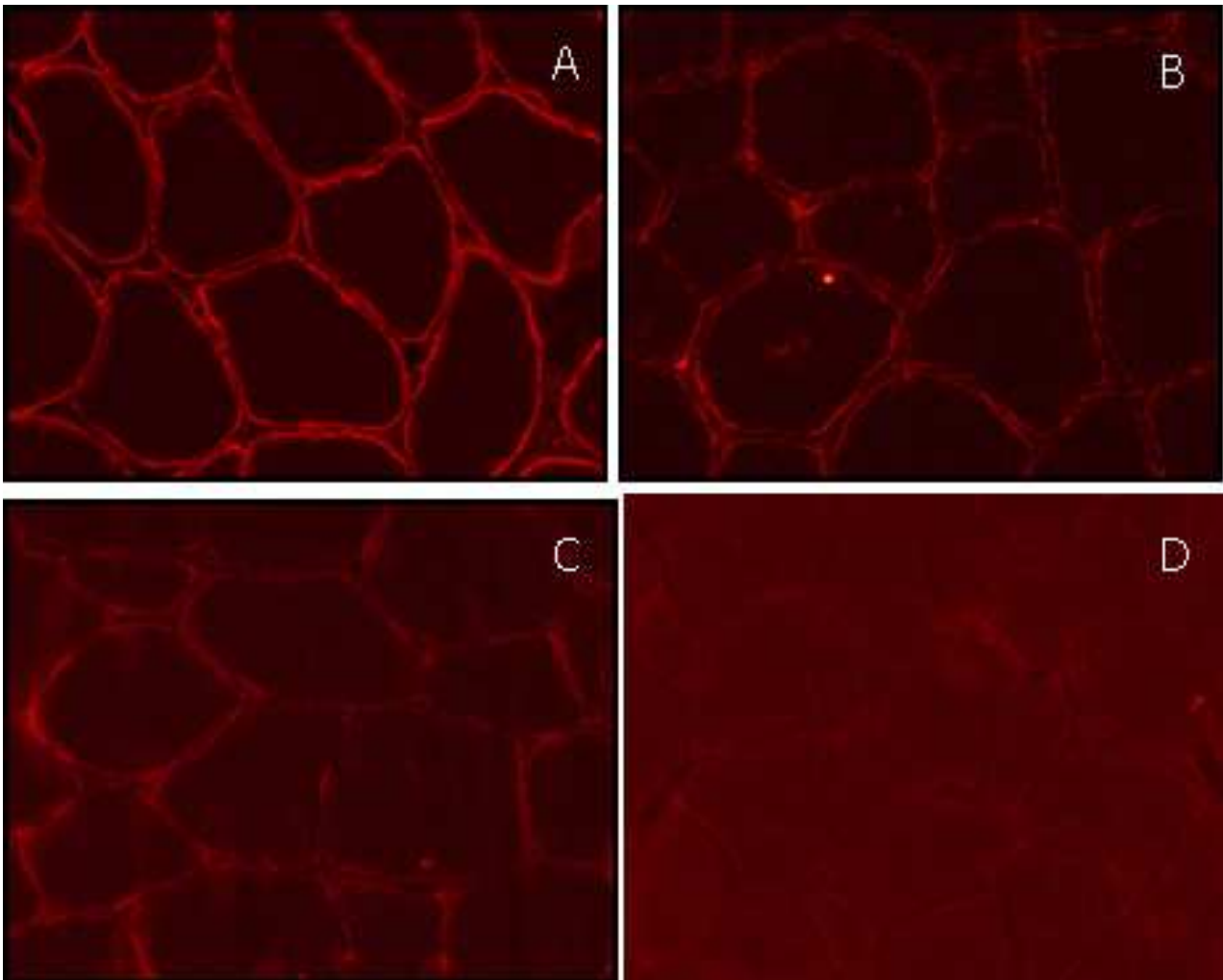


Figura 5. Studio di immunoistochimica dell' α -distroglicano in alcuni pazienti rappresentativi.

Sezioni di biopsia muscolare marcate con anticorpo IIH6 diretto contro l'epitopo glicosilato dell' α -DG. Normale espressione nel muscolo di controllo (pannello A), ridotta glicosilazione in 2 pazienti (pannello B e C) e totale assenza in un paziente (pannello D).

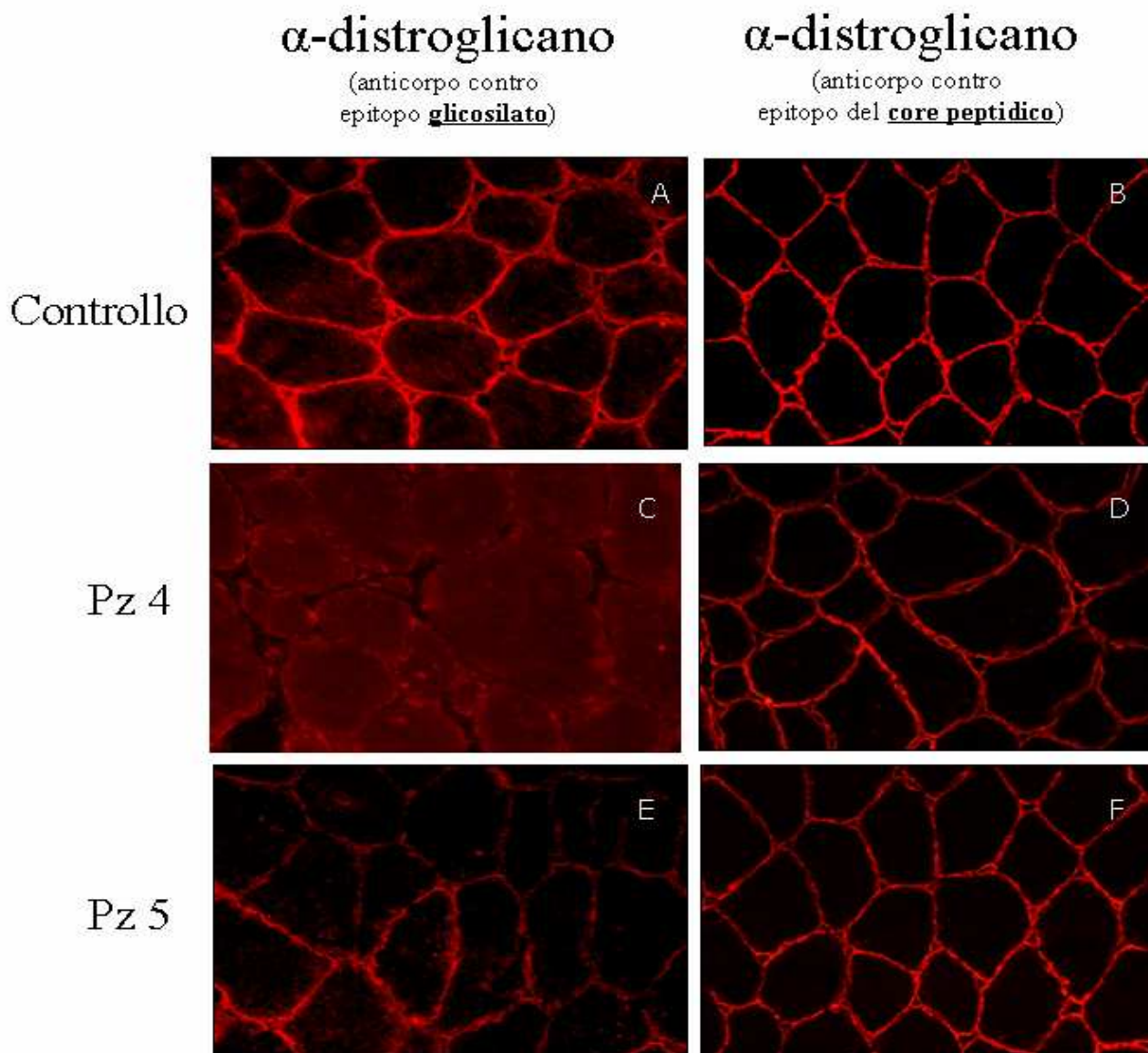


Figura 6. Confronto tra l'anticorpo IH6 diretto contro la porzione glicosilata dell' α -DG e l'anticorpo diretto contro il core peptidico dell' α -DG.

Nei pannelli A e B muscolo di controllo. Il paziente 4 mostra assenza di glicosilazione dell' α -DG (pannello C) rispetto al controllo, ma presenza della componente proteica di α -DG (pannello D). Il paziente 5 mostra parziale difetto di glicosilazione di α -DG (pannello E), ma normale reattività per il core peptidico (pannello F).

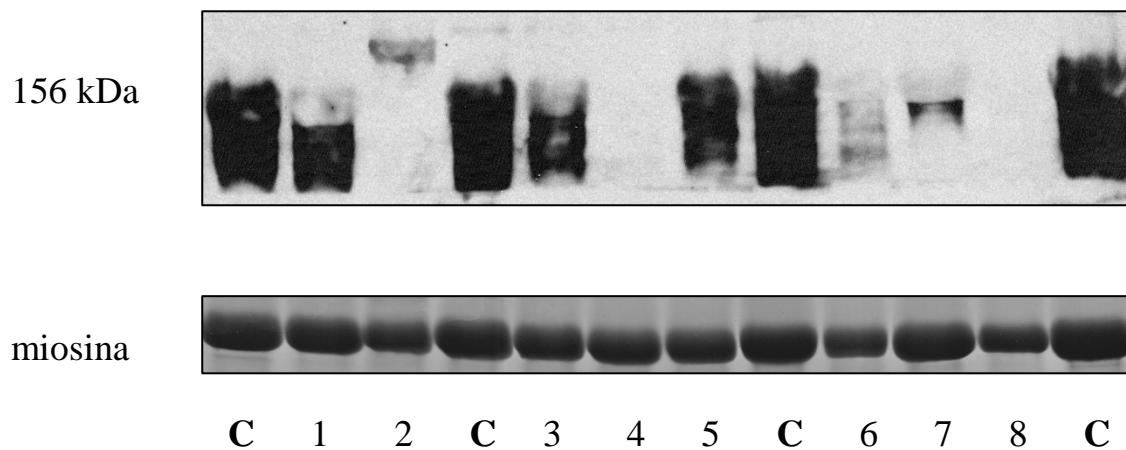


Figura 7. Studio di immunoblot dell' α -DG in alcuni pazienti rappresentativi.

Nel pannello superiore è mostrata la banda corrispondente all' α -DG glicosilato utilizzando l'anticorpo I1H6. Nel pannello inferiore il gel colorato, dopo trasferimento, con Coomassie Blue per visualizzare la catena pesante della miosina utilizzata per normalizzare la quantità di proteine caricate. L' α -DG glicosilato appare come una ampia banda nei controlli (C), è assente nei pazienti 4 e 8, presente in tracce con alterato peso molecolare nei pazienti 2, 6 e 7. I pazienti 1 e 3 presentano una variazione del bandeggio con quantità di α -DG inferiore della norma. Il paziente 5 ha solo una modesta riduzione della glicosilazione della proteina.

Figura 8. Rappresentazione schematica del gene *FKRP* con indicate le mutazioni identificate nel presente lavoro (TMD=dominio transmembrana).

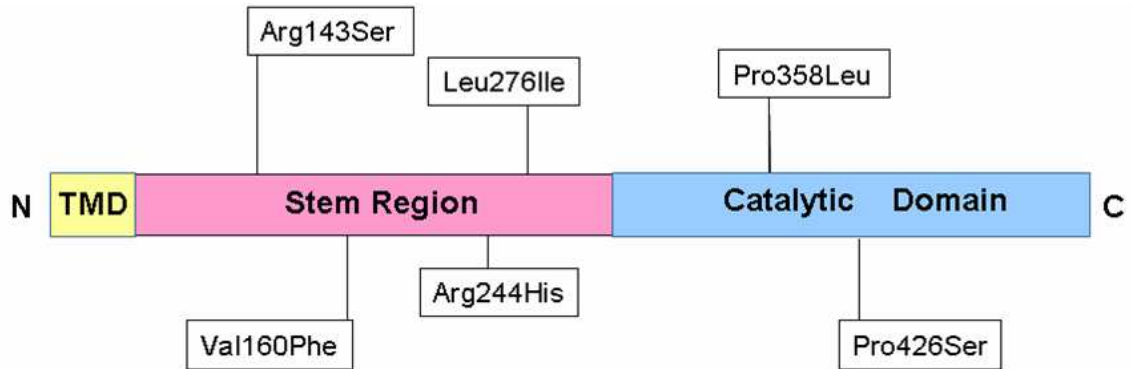
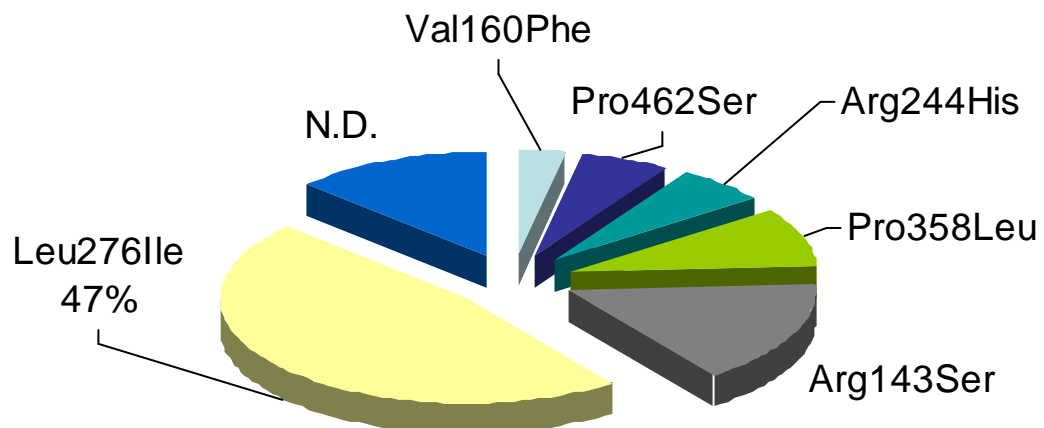


Figura 9. Rappresentazione della frequenza degli alleli mutati per il gene *FKRP*.



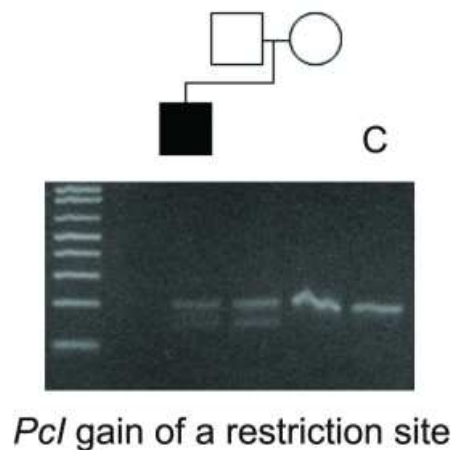
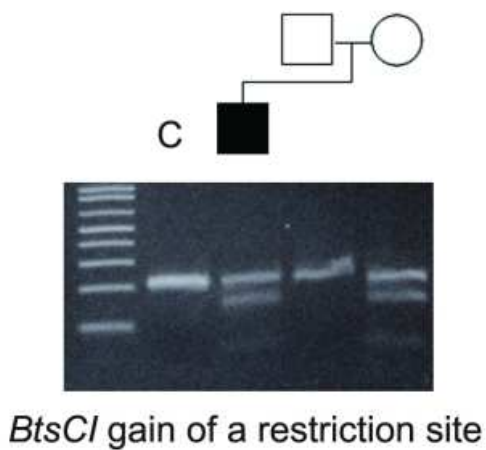
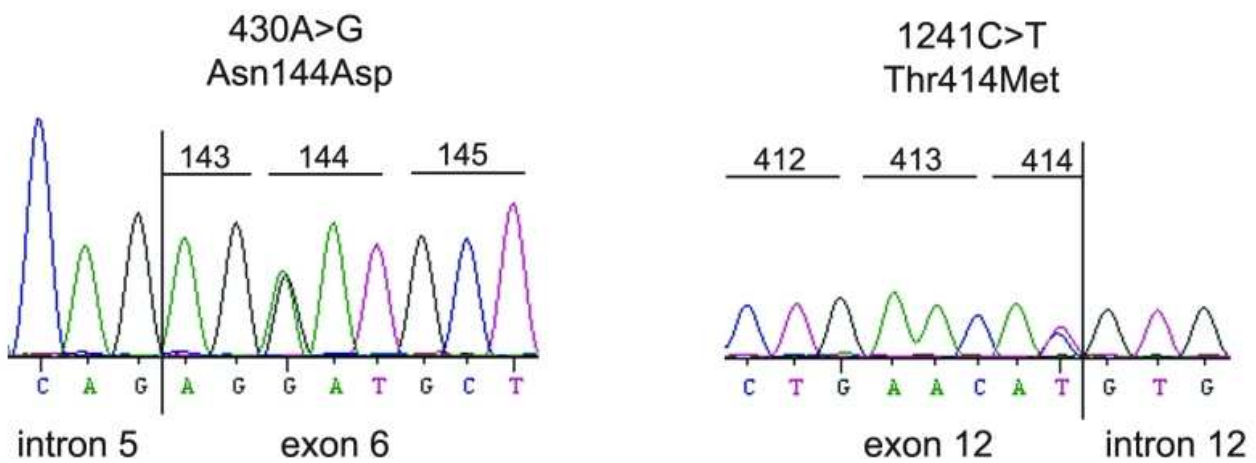


Figura 10. Esempio di cromatogrammi al sequenziatore automatico e digestione enzimatica per mutazioni nel gene *POMT1*.

Nel pannello superiore sono mostrati i cromatogrammi delle mutazioni missenso, Asn144Asp e Thr414Met, identificate nel paziente 17. Nei pannelli inferiori la segregazione della mutazione nella famiglia tramite analisi dei frammenti di restrizione.

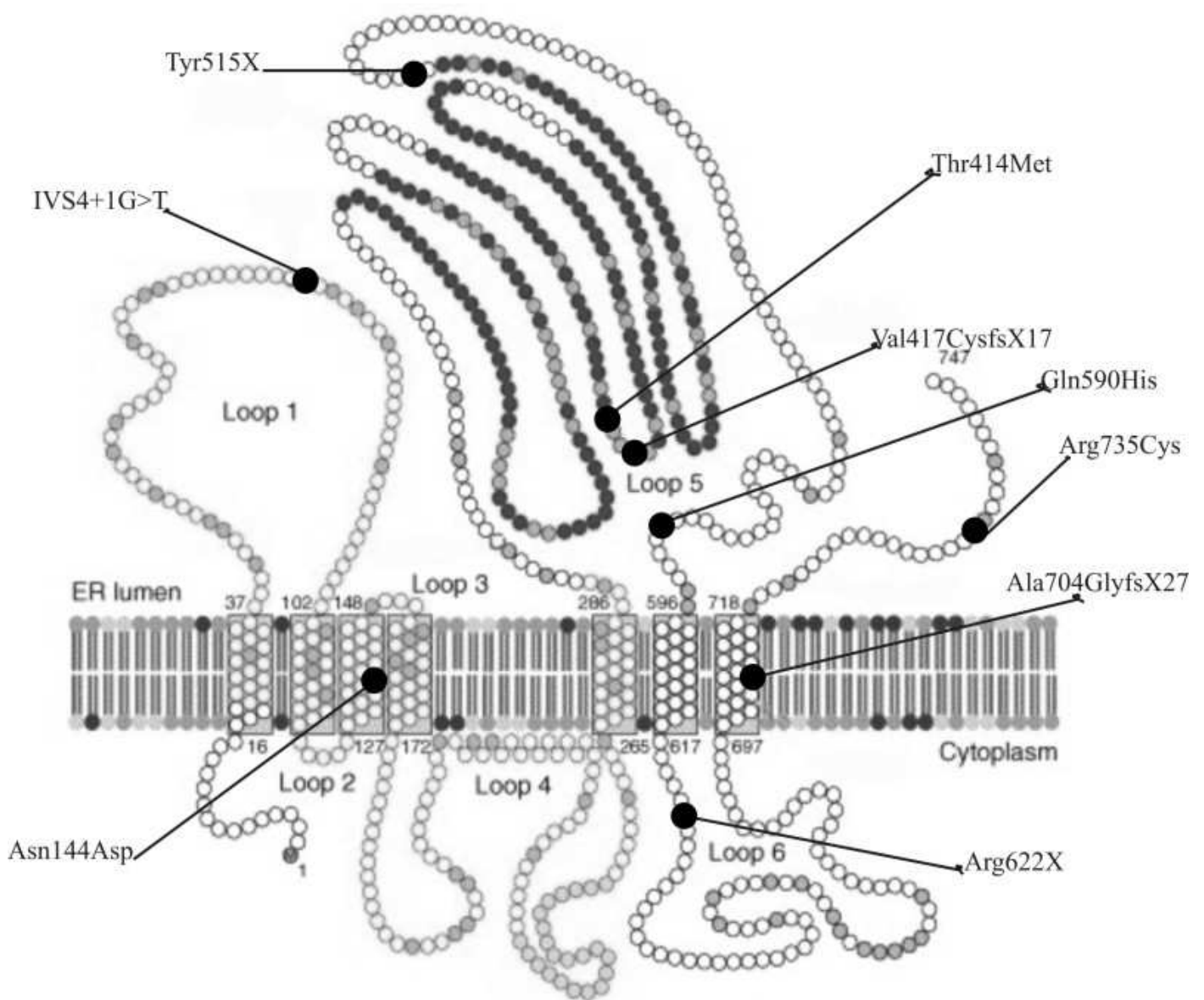


Figura 11. Struttura della proteina POMT1 con indicati i residui aminoacidici mutati identificati nel nostro lavoro (modificata da Willer et al., 2003).

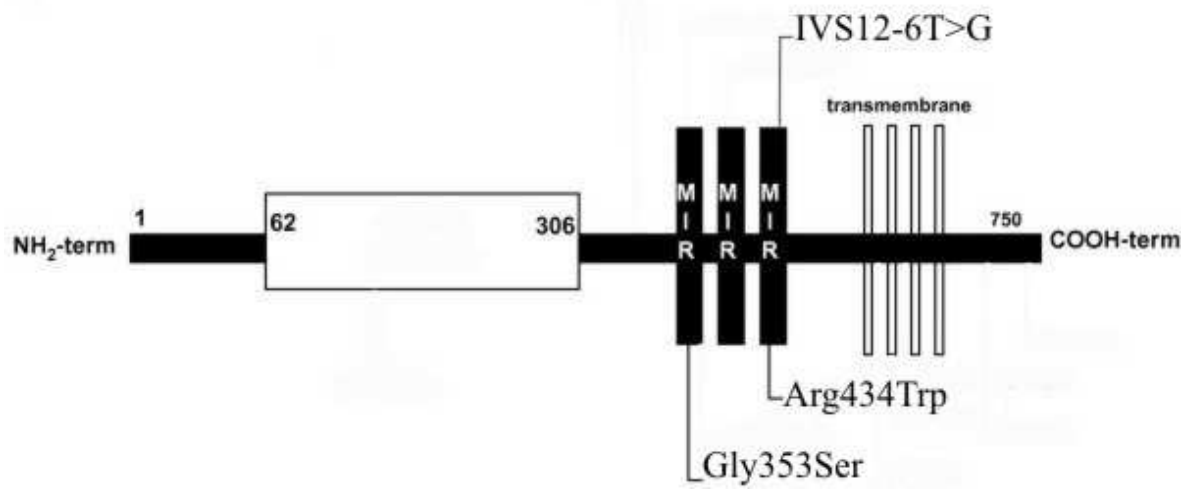


Figura 12. Rappresentazione schematica del gene *POMT2* con indicate le mutazioni identificate nel presente lavoro e i domini conosciuti (modificata da Biancheri et al., 2007).

BIBLIOGRAFIA

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

Allamand V, Sunada Y, Salih MAM, Straub V, Ozo CO, Al-Turaiki MHS, Akbar M, Kolo T, Colognato H, Zhang X, Sorokin LM, Yurchenco PD, Tryggvason K, Campbell KP.. Mild congenital muscular dystrophy in two patients with an internally deleted laminin α 2-chain. *Hum Mol Genet* 1997; 6:747-752;

Akasaka-Manya K, Manya H, Endo T. Mutations of the POMT1 gene found in patients with Walker-Warburg syndrome lead to a defect of protein O-mannosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325:75-79;

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; 80:319-334;

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; 32:709-726;

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;

Biancheri R, Falace A, Tessa A, Pedemonte M, Scapolan S, Cassandrini D, Aiello C, Rossi A, Broda P, Zara F, Santorelli FM, Minetti C, Bruno C. POMT2 gene mutation in limb-girdle muscular dystrophy with inflammatory changes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363:1033-1037;

Blake DJ. Dystrobrevin dynamics in muscle-cell signalling: a possible target for therapeutic intervention in Duchenne muscular dystrophy? *Neuromuscul Disord* 2002; 12:S110-117;

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;

Bowe MA, Deyst KA, Leszyk JD, Fallon JR. Identification and purification of an agrin receptor from Torpedo postsynaptic membranes: a heteromeric complex related to the dystroglycans. *Neuron* 1994; 12:1173-1180;

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; 499: 210-214;

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* 2001; 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* 2001; 10:2851-2859;

Brockington M, Torelli S, Prandini P, Boito C, Dolatshad NF, Longman C, Brown SC, Muntoni F. Localization and functional analysis of the LARGE family of glycosyltransferases: significance for muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 657-665;

Brown SC, Torelli S, Brockington M, Yuva Y, Jimenez C, Feng L, Anderson L, Ugo I, Kroger S, Bushby K, Voit T, Sewry C, Muntoni F. Abnormalities in alpha-dystroglycan expression in MDC1C and LGMD2I muscular dystrophies. *Am J Pathol* 2004; 164:727-737;

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* 1999; 8:1875-1882;

Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 1995, 80:675-679;

Cao W, Henry MD, Borrow P, Yamada H, Elder JH, Ravkov EV, Nichol ST, Compans RW, Campbell KP, Oldstone MB. Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science*. 1998; 282:2079-2081;

Caro PA, Scavina M, Hoffman EP, Pegoraro E, Marks HG. 1999. MR imaging findings in children with merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Am J Neuroradiol* 20:324-326;

Chiba A, Matsumura K, Yamada H, Inazu T, Shimizu T, Kusunoki S, Kanazawa I, Kobata A, Endo T. Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve alpha-dystroglycan. The role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of alpha-dystroglycan with laminin. *J Biol Chem* 1997; 272:2156-2162;

Clement EM, Godfrey C, Tan J, Brockington M, Torelli S, Feng L, Brown SC, Jimenez-Mallebrera C, Sewry CA, Longman C, Mein R, Abbs S, Vajsar J, Schachter H, Muntoni F. Mild POMGnT1 mutations underlie a novel limb-girdle muscular dystrophy variant. *Arch Neurol* 2008; 65:137-141;

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; 272:31221-31224;

Currier SC, Lee CK, Chang BS, Bodell AL, Pai GS, Job L, Lagae LG, Al-Gazali LI, Eyaid WM, Enns G, Dobyns WB, Walsh CA. Mutations in POMT1 are found in a minority of patients with Walker-Warburg syndrome. *Am J Med Genet A* 2005; 133A:53-57;

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; 40:845-848;

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; 40:845-848;

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 FKRP gene: the other end of the spectrum. *Europ J Hum Genet* 2003; 11:923-930;

Di Blasi C, Mora M, Pareyson D, Farina L, Sghirlanzoni A, Vignier N, Blasevich F, Cornelio F, Guicheney P, Morandi L. Partial laminin $\alpha 2$ chain deficiency in a patient with myopathy resembling inclusion body myositis. *Ann Neurol* 2000; 47:811-816;

Diesen C, Saarinen A, Pihko H, Rosenlew C, Cormand B, Dobyns WB, Dieguez J, Valanne L, Joensuu T, Lehesjoki AE. POMGnT1 mutation and phenotypic spectrum in muscle-eye-brain disease. *J Med Genet* 2004; 41:e115;

Dubowitz V. 1994. Workshop report on the 22nd ENMC sponsored workshop on congenital muscular dystrophy held in Baarn, The Netherlands, 14-16 may 1993. In: *Neuromusc Disord* 4:75-81;

Dubowitz V, Fardeau M. 1995. Workshop report on the 27th ENMC sponsored workshop on congenital muscular dystrophy, The Netherlands, 22-24 april 1994. In: *Neuromusc Disord* 5:253-258;

Dubowitz V. 1999. Workshop report on the 68th ENMC sponsored workshop on congenital muscular dystrophy held in Naardee, The Netherlands, 9-11 april 1999. In: *Neuromusc Disord* 9:446-454;

Endo T, Toda T. Glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Biol Pharm Bull.* 2003; 26:1641-1647;

Endo T, Aberrant glycosylation of alfa-dystroglican and congenital muscular dystrophies. *Acta Myol* 2005; 24:64-69;

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

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;

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; 11:3319-3331;

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;

Fujimura K, Sawaki H, Sakai T, Hiruma T, Nakanishi N, Sato T, Ohkura T, Narimatsu H. LARGE2 facilitates the maturation of alpha-dystroglycan more effectively than LARGE. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329:1162-1171;

Godfrey C, Escolar D, Brockington M, Clement EM, Mein R, Jimenez-Mallebrera C, Torelli S, Feng L, Brown SC, Sewry CA, Rutherford M, Shapira Y, Abbs S, Muntoni F. Fukutin gene mutations in steroid-responsive limb girdle muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2006; 60:603-610;

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; 130:2725-2735;

Guicheney P, Vignier N, Helbling-Leclerc A, Nissinen M, Zhang X, Cruaud C, Lambert JC, Richelme C, Topaloglu H, Merlini L, Barois A, Schwartz K, Tome' FMS, Tryggvason K, Fardeau M. Genetics of laminin $\alpha 2$ chain (or merosin) deficient congenital muscular dystrophy: from identification of mutations to prenatal diagnosis. *Neuromuscular Disorders* 1997; 7:180-186;

Guicheney P, Vignier N, Zhang X, He Y, Cruaud C, Frey V, Helbling-Leclerc A, Richard P, Estournet B, Merlini L, Topaloglu H, Mora M, Harpey JP, Haenggeli CA, Barois A, Hainque B, Schwartz K, Tome FM, Fardeau M, Tryggvason K. PCR based mutation screening of the laminin alpha2 chain gene (LAMA2): application to prenatal diagnosis and search for founder effects in congenital muscular dystrophy. *J Med Genet* 1998; 35:211-7;

Haltia M, Leivo L, Somer H, Pihko H, Paetau A, Rivela T, Tarkkanen A, Tome F, Engvall E, Santavuori P. Muscle-eye-brain disease: a neuropathological study. *Ann Neurol* 1997; 41:173-180;

Hayashi YK, Engvall E, Arikawa-Hirasawa E, Goto K, Koga R, Nonaka I, Sugita H, Arahata K. Abnormal localization of laminin subunits in muscular dystrophies. *J Neurol Sci* 1993; 119:53-64;

Hayashi YK, Koga R, Tsukahara T, Ishii H, Matsuishi T, Yamashita Y, Nonaka I, Arahata K. Deficiency of laminin α 2-chain mRNA in muscle in a patient with merosin-negative congenital muscular dystrophy. *Muscle & Nerve* 1995; 18:1027-1030;

Hayashi YK, Ishihara T, Domen K, Hori H, Arahata K. A benign allelic form of laminin α 2 chain deficient muscular dystrophy. *Lancet* 1997; 349:1147;

Hayashi YK. Membrane-repair machinery and muscular dystrophy. *Lancet* 2003; 362:843-844;

Helbling-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H, Craud C, Tesson F, Weissenbach J, Tome' FMS, Schwartz K, Fardeau M, Tryggvason K, Guicheney P. Mutations in the laminin α 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nature Genet* 1995; 11:216-218;

Henry MD, Campbell KP. Dystroglycan inside and out. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11:602-607;

Henry MD, Cohen MB, Campbell KP. Reduced expression of dystroglycan in breast and prostate cancer. *Hum Pathol* 2001; 32:791-795;

Herrmann R, Straub V, Blank M, Kutzick C, Franke N, Jacob EN, Lenard HG, Kröger S, Voit T. Dissociation of the dystroglycan complex in caveolin-3-deficient limb girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2335–2340;

Hewitt JE, Grewal PK. Glycosylation defects in inherited muscle disease. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:251-258;

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, Ilsley 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; 113:1717-1726;

Jung D, Yang B, Meyer J, Chamberlain JS, Campbell KP. Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *J Biol Chem*. 1995; 270:27305-27310;

Jurado LA, Coloma A, Cruces J. Genomics. 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; 58:171-180;

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;

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;

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, Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 1991; 252:668-674;

Lehle L, Strahl S, Tanner W. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2006; 45:6802-6818;

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;

Lo HP, Cooper ST, Evesson FJ, Seto JT, Chiotis M, Tay V, Compton AG, Cairns AG, Corbett A, MacArthur DG, Yang N, Reardon K, North KN. Limb-girdle muscular dystrophy: diagnostic evaluation, frequency and clues to pathogenesis. *Neuromuscul Disord* 2008; 18:34-44;

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 USA* 2004; 101:500-505;

Martin PT. The dystroglycanopathies: the new disorders of O-linked glycosylation. *Semin Pediatr Neurol* 2005; 12:152-158;

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; 63:251-257;

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; 18:565-571;

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

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

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

Mostacciolo ML, Miorin M, Martinello F, Angelini C, Perini P, Trevisan CP. Genetic epidemiology of congenital muscular dystrophy in a sample from north-east Italy. *Hum Genet* 1996; 97:277-279;

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

Muschler J, Levy D, Boudreau R, Henry M, Campbell K, Bissell MJ. A role for dystroglycan in epithelial polarization: loss of function in breast tumor cells. *Cancer Res* 2002; 62:7102-7109;

Nakamura Y, Tokunaga K, Toda T. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 1998; 394:388-392;

Naom I, Sewry CA, D'Alessandro M, et al. The role of immunocytochemistry and linkage analysis in the prenatal diagnosis of merosin deficient congenital muscular dystrophy. *Hum Genet* 1997; 99:535-540;

Nissinen M, Helbling-Leclerc A, Zhang X, Evangelista T, Topaloglu H, Craud C, Weissenbach J, Fardeau M, Tome' FMS, Schwartz K, Tryggvason K, Guicheney P. Substitution of a conserved cysteine-996 in a cysteine-rich motif of the laminin α 2-chain in congenital muscular dystrophy with partial deficiency of the protein. *Am J Hum Genet* 1996; 58:1177-1184;

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;

Orita, M., et al. Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel Electrophoresis as SSCPs. *PNAS* 1989; 86:2766-2770;

Pegoraro E, Mancias P, Swerdlow SH, Raikow RB, Garcia C, Marks H, Crawford T, Carver V, Di Cianno B, Hoffman EP. Laminin α 2 (merosin) gene mutations cause congenital muscular dystrophy (CMD). *Ann Neurol* 1996; 40:782-791;

Pegoraro E, Marks H, Garcias CA, Crawford T, Mancias P, Connolly AM, Fanin M, Martinello F, Trevisan CP, Angelini C, Stella A, Scavina M, Munk RL, Servidei S, Bönnemann CC, Bertorini T, Acsadi G, Thompson CE, Gagnon D, Hoganson G, Carver V, Hoffman EP. Laminin α 2 muscular dystrophy: genotype/phenotype study in 22 patients. *Neurology* 1998; 51:101-110;

Pegoraro E, Fanin M, Trevisan CP, Angelini C, Hoffman EP. Identification of a novel laminin α 2 isoform in a severe laminin α 2 deficient CMD patient. *Neurology* 2000; 55:1128-1234;

Peng HB, Ali AA, Daggett DF, Rauvala H, Hassell JR, Smalheiser NR. The relationship between perlecan and dystroglycan and its implication in the formation of the neuromuscular junction *Cell Adhes Commun* 1998; 5:475-489;

Peter-Katalinić J. Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins. *Methods Enzymol* 2005; 405:139-171;

Philpot J, Topaloglu H, Pennock J, Dubowitz V. Familial concordance of brain magnetic resonance imaging changes in congenital muscular dystrophy. *Neuromusc Disord* 1995; 5:227-231;

Prados B, Peña A, Cotarelo RP, Valero MC, Cruces J. Expression of the murine *Pomt1* gene in both the developing brain and adult muscle tissues and its relationship with clinical aspects of Walker-Warburg syndrome. *Am J Pathol* 2007; 170:1659-1668;

Rambukkana A, Yamada H, Zanazzi G, Mathus T, Salzer JL, Yurchenco PD, Campbell KP, Fischetti VA. Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science* 1998; 282:2076-2079;

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; 268:4590-4597;

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; 39:173-181;

Sciandra F, Gawlik KI, Brancaccio A, Durbeej M. Dystroglycan: a possible mediator for reducing congenital muscular dystrophy? *Trends Biotechnol*. 2007; 25:262-268;

Sewry CA, Philpot J, Sorokin L et al. Diagnosis of merosin (laminin alpha2)-deficient congenital muscular dystrophy by skin biopsy. *Lancet* 1996; 347:582-584;

Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 1987; 15:7155-7174;

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; 40:14585-14592;

Sunnucks P, et al., SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol* 2000; 9:1699-1710;

Tan E, Topaloglu H, Sewry C, Zorlu Y, Naom I, Erdem S, et al. Late onset muscular dystrophy with cerebral white matter changes due to partial merosin deficiency. *Neuromusc Disord* 1997; 7:85-89;

Timpl R, Rohde H, Gehron Robey P, et al. Laminin a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 1979; 254:9933-9937;

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* 2003; 43:97-104;

Vachon, P.H., H. Xu, L. Liu, F. Loechel, Y. Hayashi, K. Arahata, J.C. Reed, J.C., E.M. Wewer, and E. Engvall. Integrins ($\alpha7\beta1$) in muscle function and survival. Disrupted expression in merosin-deficient congenital muscular dystrophy *J Clin Invest* 1997; 100:1870-1881;

Van der Knaap MS, Smit LME, Barth PG, Catsman-Berrevoets CE, Brouwer OF, Begeer JH, de Coo IFM, Valk J. Magnetic resonance imaging in classification of congenital muscular dystrophies with brain abnormalities. *Ann Neurol* 1997; 42:50-59;

van Reeuwijk J, Maugendre S, van den Elzen C, Verrips A, Bertini E, Muntoni F, Merlini L, Scheffer H, Brunner HG, Guicheney P, van Bokhoven H. The expanding phenotype of POMT1 mutations: from Walker-Warburg syndrome to congenital muscular dystrophy, microcephaly, and mental retardation. *Hum Mutat* 2006; 27:453-459;

Wagner, John., Screening Methods for Detection of Unknown Point Mutations. 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;

Willer T, Amselgruber W, Deutzmann R, Strahl S. Characterization of POMT2, a novel member of the PMT protein O-mannosyltransferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids. *Glycobiology* 2002; 12:771-783;

Willer T, Valero MC, Tanner W, Cruces J, Strahl S. O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr Opin Struct Biol* 2003; 13:621-30;

Willer T, Prados B, Falcón-Pérez JM, Renner-Müller I, Przemeck GK, Lommel M, Coloma A, Valero MC, de Angelis MH, Tanner W, Wolf E, Strahl S, Cruces J. Targeted disruption of the Walker-Warburg syndrome gene *Pomt1* in mouse results in embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:14126-14131;

Williamson RA, Henry MD, Daniels KJ, Hrstka RF, Lee JC, Sunada Y, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Campbell KP. Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in *Dag1*-null mice. *Hum Mol Genet* 1997; 6:831-841;

Xiong H, Kobayashi K, Tachikawa M, Manya H, Takeda S, Chiyonobu T, Fujikake N, Wang F, Nishimoto A, Morris GE, Nagai Y, Kanagawa M, Endo T, Toda T. Molecular interaction between fukutin and POMGnT1 in the glycosylation pathway of alpha-dystroglycan. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350:935-941;

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;

Yang B, Jung D, Motto D, Meyer J, Koretzky G, Campbell KP. SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem* 1995; 270:11711-11714;

Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN, An efficient procedure for genotyping single nucleotide *polymorphisms*. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:e88;

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; 1:717-724;

Zhang W, Vajsar J, Cao P, Breningstall G, Diesen C, Dobyns W, Herrmann R, Lehesjoki AE, Steinbrecher A, Talim B, Toda T, Topaloglu H, Voit T, Schachter H. Enzymatic diagnostic test for Muscle-Eye-Brain type congenital muscular dystrophy using commercially available reagents. *Clin Biochem* 2003; 36:339-344.