

# Distroglicanopatías: aspectos clínicos y bases genéticas y moleculares de las distrofias musculares causadas por defectos en la glicosilación del $\alpha$ -distroglicano

*Dystroglycanopathies: clinical manifestations and genetics and molecular basis of the muscular dystrophies caused by defective glycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan*

**Griselda Vélez Aguilera,\* Bulmaro Cisneros Vega\***

\* Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), México, DF.

Dirección para correspondencia:  
**Dr. Bulmaro Cisneros Vega**  
 Av. Instituto Politécnico Nacional  
 Núm. 2508,  
 Col. San Pedro Zacatenco,  
 Del. Gustavo A. Madero, 07360,  
 México, D.F., México.  
 Tel: +52 55 5061 3339  
 Fax: +52 55 5061 3931  
 E-mail: bcisnero@cinvestav.mx

Recibido: 27 de julio de 2015.  
 Aceptado: 18 de agosto de 2015.

Este artículo puede ser consultado  
 en versión completa en:  
<http://www.medigraphic.com/rid>

## Abreviaturas:

DAPC = Complejo de proteínas asociadas a distrofina.  
 $\alpha$ -DG =  $\alpha$ -distroglicano.  
 $\beta$ -DG =  $\beta$ -distroglicano.  
 WWS = Síndrome de Walker-Warburg.  
 MEB = Desorden muscular músculo-ojos-cerebro.  
 FCMD = Distrofia muscular congénita de Fukuyama.  
 LGMD = Distrofia muscular de cinturas.  
 CMD = Distrofia muscular congénita.

## Resumen

Las distrofias musculares del humano se deben a la ausencia o mal funcionamiento de proteínas esenciales para el tejido muscular. Un grupo importante está relacionado con mutaciones en genes que codifican para los miembros del complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DAPC). El DAPC comunica la matriz extracelular con el citoesqueleto y le confiere estabilidad al sarcolema durante los ciclos de contracción-relajación. Un componente primordial de este ensamblaje proteico es el distroglicano, el cual es codificado por el gen *DAG1* y procesado post-traduccionalmente para generar dos subunidades: la proteína transmembranal  $\beta$ -distroglicano ( $\beta$ -DG) y la proteína extracelular  $\alpha$ -distroglicano ( $\alpha$ -DG). Los distroglicanos conectan la matriz extracelular con el citoesqueleto de actina, ya que el  $\beta$ -DG se une a la distrofina y ésta, a su vez, con la actina, mientras que el  $\alpha$ -DG interacciona con la proteína de matriz extracelular laminina y conecta, al mismo tiempo, con el  $\beta$ -DG. La glicosilación del  $\alpha$ -DG le confiere la capacidad de asociarse con la matriz extracelular. De manera relevante, una serie particular de distrofias musculares, denominadas «distroglicanopatías» se origina precisamente por defectos en la glicosilación del  $\alpha$ -DG. Las distroglicanopatías primarias se deben a mutaciones puntuales homocigotas en el gen *DAG1*, mientras que las distroglicanopatías secundarias son causadas por mutaciones en al menos 15 genes que codifican para enzimas implicadas en la vía de glicosilación del  $\alpha$ -DG. Entre las distroglicanopatías más estudiadas se encuentran el síndrome de Walker-Warburg, el desorden muscular músculo-ojos-cerebro, la distrofia muscular congénita de Fukuyama, las distrofias musculares congénitas 1C y 1D, y la distrofia muscular de cintura. En esta revisión, describimos las manifestaciones clínicas de las diferentes distroglicanopatías y presentamos una visión actual de las bases genéticas y moleculares que subyacen estas patologías. En la parte final, describimos los modelos animales que se han generado para el estudio de las distroglicanopatías y el incipiente desarrollo de terapias para combatirlas.

## Abstract

*In general, human muscular dystrophies are caused by mutations in genes encoding for key proteins of the muscular tissue. A specific group of muscular dystrophies is related to mutations in genes encoding for members of the dystrophin-associated protein complex (DAPC). The DAPC links the extracellular matrix with the actin-based cytoskeleton, conferring thereby stability to the sarcolemma during cycles of muscular contraction/relaxation. A pivotal component of this assembly is dystroglycan, a protein encoded by the *DAG1* gene, which is post-translationally processed into two subunits;  $\alpha$ - and  $\beta$ -dystroglycan.  $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$ -DG) is an extracellular*

**Palabras clave:** Distrofia muscular, distroglicanopatías,  $\alpha$ -dístroglicano, glicosiltransferasas, glicosilación.

**Key words:** Muscular dystrophy, dystroglycanopathies,  $\alpha$ -dystroglycan, glycosyltransferase, glycosylation.

*protein that interacts with the extracellular protein laminin, while  $\beta$ -dystroglycan ( $\beta$ -DG) is a transmembranal protein that associates with both  $\alpha$ -DG and actin. Therefore,  $\alpha$ - and  $\beta$ -DG communicate the extracellular matrix with the actin-based cytoskeleton.  $\alpha$ -DG requires to be glycosylated to properly interact with laminin, and such posttranslational modification has biological relevance because a series of muscular dystrophies called «dystroglycanopathies» are caused by defective  $\alpha$ -DG glycosylation. Primary dystroglycanopathies are due to homozygous mutations in the DAG1 gene, while secondary dystroglycanopathies are caused by mutations in at least 15 different genes involved in the  $\alpha$ -DG glycosylation pathway. The most characterized dystroglycanopathies include the Walker-Warburg syndrome, muscle-eye-brain disease, congenital muscular dystrophies 1C and 1D, and limb-girdle muscular dystrophy. In this review, we describe the clinical aspects of the different dystroglycanopathies and present an updated view of the genetic and molecular mechanisms underlying these pathologies. Finally, we describe the animal models and therapeutic strategies designed to fight dystroglycanopathies.*

## Antecedentes

El músculo esquelético está formado por miles de fibras musculares que se unen entre sí para integrar una unidad muscular. Estas fibras poseen una estructura especializada que le confiere estabilidad al tejido muscular durante los procesos de contracción muscular y transmisión de fuerza. Las fibras musculares son multinucleadas, ya que se forman por la fusión de varias células denominadas «mioblastos» y están rodeadas por una membrana citoplasmática especializada denominada «sarcolema»; por medio de ella interactúan con la matriz extracelular.<sup>1</sup> La deficiencia en el funcionamiento de las fibras musculares ocasiona daños irreversibles en el sistema muscular y la aparición de distrofia muscular.

Las distrofias musculares son un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias que afectan tanto a los niños como a los adultos; se caracterizan por debilidad muscular progresiva y degeneración de las fibras musculares, las cuales son invadidas por tejido conectivo.<sup>1</sup> En los últimos 20 años, el análisis genético de familias con pacientes distróficos y el advenimiento de la genética molecular coadyuvó en la identificación y clonación de genes esenciales para el funcionamiento del tejido muscular, los cuales en su forma mutante originan diferentes distrofias musculares.<sup>2</sup> A la fecha, se han identificado más de 40 distrofias musculares, que se han dividido tanto por la sintomatología que presentan como por la localización subcelular de la proteína alterada.

Un grupo importante de distrofias musculares se origina por defectos en el funcionamiento de la distrofina o sus proteínas asociadas, las cuales son conocidas colectivamente como el «complejo de proteínas asociadas a la distrofina» (DAPC, por sus siglas en inglés: *dystrophin-associated protein complex*). El DAPC está compuesto por proteínas perifé-

ricas, transmembranales y citoplásmicas; con base en sus características bioquímicas se puede disociar en tres subcomplejos: a) los distroglicanos ( $\alpha$ - y  $\beta$ ); b) los sarcoglicanos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$ ) y el sarcospan, y c) las distrobrevinas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y las sintrofinas ( $\alpha$ 1,  $\beta$ -1 and  $\beta$ -2).<sup>3</sup> Una de las funciones que se le adjudican al DAPC es la de comunicar a la matriz extracelular con el citoesqueleto de actina y, de esta manera, mantener la integridad del sarcolema durante los ciclos de contracción y relajación muscular.<sup>4</sup> Así mismo, la comunicación entre estos dos compartimentos constituye la ruta principal de la transmisión de fuerza desde los sarcómeros hasta los tejidos conectivos extracelulares.<sup>5</sup> Recientemente, se demostró que el DAPC participa, además, en procesos de transducción de señales mediante la interacción que establece con moléculas de señalización como nNOS, Grb2 y calmodulina.<sup>6</sup> Se conoce que la ausencia o deficiencia funcional de cualquiera de los miembros del DAPC provoca la desintegración del complejo, lo que daña al sarcolema durante la contracción muscular. El daño sobre la membrana permite la entrada de calcio al interior de la célula y la salida hacia el espacio extracelular de enzimas musculares como la creatinina fosfocinasa; esta serie de eventos conduce finalmente a la necrosis del tejido muscular, sin que la regeneración exacerbada de células musculares que presentan los pacientes distróficos alcance a sustituir todo el tejido lesionado.<sup>7</sup> La deficiencia de la distrofina causa la aparición de la distrofia muscular de Duchenne, una enfermedad con herencia ligada al cromosoma X,<sup>3</sup> mientras que mutaciones en cualquiera de los genes que codifican para los sarcoglicanos originan las distrofias de cinturas (LG, por sus siglas en inglés), las cuales se heredan de forma autosómica recesiva.<sup>2</sup> Finalmente, la deficiencia en la glicosilación del  $\alpha$ -dístroglicano da lugar a una categoría particular de distrofias musculares conocidas

como «dístroglicanopatías».<sup>8</sup> En la presente revisión proveemos una visión actual de las manifestaciones clínicas y las bases genéticas y bioquímicas de este conjunto particular de padecimientos musculares.

## El dístroglicano

El dístroglicano es un componente central del complejo de proteínas asociadas a dístrofina. Este ensamblaje proteico conecta la matriz extracelular con el citoesqueleto, proporcionando estabilidad al sarcolema durante la contracción muscular.<sup>9</sup> El dístroglicano (DG) es codificado por el gen *DAG1* que se localiza en el cromosoma 3p21 humano; el gen consta de dos exones separados por un intrón y genera un transcrito de 5.8 Kb. La expresión del gen *DAG1* se extiende a una amplia variedad de órganos y tejidos, incluyendo cerebro, músculo esquelético, corazón, pulmón, placenta, hígado, riñón y páncreas, y se presenta también en diferentes etapas del desarrollo.<sup>10</sup> La traducción del gen *DAG1* produce un propéptido de 97 KDa, el cual es procesado mediante un corte proteolítico en la serina 653 para generar dos subunidades, el  $\alpha$ -dístroglicano ( $\alpha$ -DG) y el  $\beta$ -dístroglicano ( $\beta$ -DG). A pesar de esta separación, las subunidades  $\alpha$ -DG y  $\beta$ -DG se unen de nuevo de manera no covalente en la membrana plasmática.<sup>11</sup>

El  $\alpha$ -DG es una proteína extracelular que posee un dominio N-terminal globular, un dominio central parecido a la mucina que sufre una abundante glicosilación, y un dominio C-terminal globular. Los primeros 29 aminoácidos son en su mayoría hidrofóbicos y constituyen el péptido señal que dirige a la proteína a la membrana plasmática. El dominio N-terminal globular posee sitios para N-glicosilación, y el dominio central, para O-glicosilación (Figura 1). El grado de glicosilación del  $\alpha$ -DG varía dependiendo del tejido, lo que provoca que aunque su masa molecular predicha es de ~75 kDa, su migración en geles de poliacrilamida desnaturalizantes varíe entre 120 y 180 kDa.<sup>10</sup> La glicosilación del  $\alpha$ -DG le confiere la capacidad para asociarse con proteínas

de la matriz extracelular como la laminina, la agrina y el perlecano.<sup>12</sup>

Por su parte, el  $\beta$ -DG es una proteína transmembranal de 43 kDa que está formada por un dominio aminoterminal extracelular que contiene un sitio potencial de N-glicosilación, un segmento transmembranal y un dominio C-terminal intracelular rico en prolinas que contiene el dominio funcional PPxY (Figura 1); esta secuencia de aminoácidos corta es importante para la interacción del  $\beta$ -DG con la dístrofina<sup>13</sup> y la caveolina.<sup>14</sup> Además, el  $\beta$ -DG presenta una señal de localización nuclear (NLS) en el dominio intracelular que media su ingreso al núcleo a través del sistema de transporte nuclear de las  $\alpha/\beta$ -importinas<sup>15</sup> y le permite interactuar con la ezrina para modular la remodelación del citoesqueleto de actina.<sup>16</sup>

El  $\alpha/\beta$ -DG está implicado en el desarrollo embrionario temprano, la estructura y función del sistema nervioso central, la morfogénesis epitelial, la adhesión celular, la sinaptogénesis y la señalización. Específicamente, el  $\beta$ -DG está involucrado en la estructuración y función de la envoltura nuclear.<sup>15,17-19</sup>

## La glicobiología del $\alpha$ -DG

La unión del  $\alpha$ -DG con los ligandos de la matriz extracelular depende de su estado de glicosilación;<sup>21</sup> sin embargo, la vía enzimática de glicosilación, así como la función exacta que le confieren las cadenas de carbohidratos, empieza apenas a desentrañarse. Hasta el momento, se conocen siete distintas glicosiltransferasas que participan en la glicosilación del  $\alpha$ -DG:<sup>20</sup> las O-manosiltransferasas 1 y 2 (POMT-1 y POMT-2), la O-manosa  $\beta$ -1, 2-N-acetilglucosaminil transferasa 1 (POMGnT1), la proteína similar a la acetilglucosaminil transferasa (LARGE), LARGE 2 (gen parálogo de LARGE), la fukutina y la proteína relacionada a la fukutina (FKRP).<sup>22</sup> Además, se han identificado otras enzimas que participan en este proceso, como son el dominio de sintetasa isoprenoide (ISPD), la proteína transmembranal 5 (TMEM5), la  $\beta$ 1,

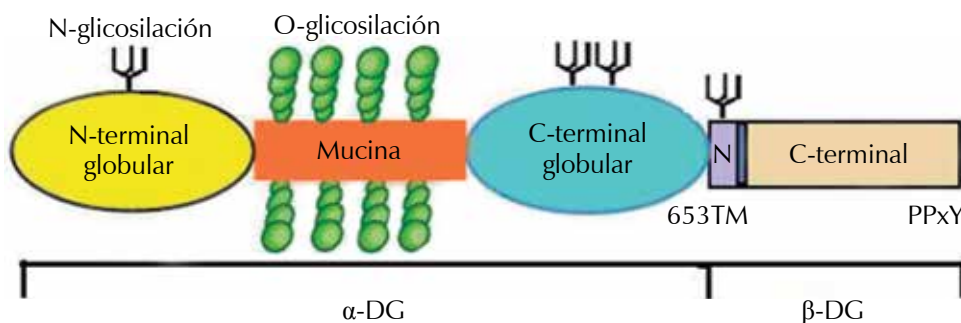


Figura 1.

Dominios de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del dístroglicano (modificado de [20]).

3-N-acetilglucosaminiltransferasa 1 (B3GNT1), la  $\beta$ 1, 3-N-acetilgalactosaminil-transferasa 2 (B3GALNT2), la dolcil-fosfato manosiltransferasa polipéptido 1, 2 y 3 (DPM1, DPM2 y DPM3), la dolicol cinasa (DOLK) y la GDP-manosa pirofosforilasa B (GMPPB).

Las enzimas POMT1 y POMT2 son proteínas de membrana tipo III localizadas en el retículo endoplásmico que forman un heterodímero para llevar a cabo el primer paso en la O-manosilación.<sup>22,23</sup> Posteriormente, POMGnT1, localizada en el aparato de Golgi, cataliza la transferencia de residuos de N-acetilglucosamina a los O-manosa glicanos.<sup>24</sup> La enzima LARGE posee un dominio transmembranal seguido de un dominio de  $\alpha$  hélice y dos dominios catalíticos DxD.<sup>25</sup> La interacción de LARGE con el dominio N-terminal del  $\alpha$ -DG se requiere para que se inicie correctamente la glicosilación de esta última proteína,<sup>26</sup> por lo que se piensa que LARGE es una glicosiltransferasa. Con lo que respecta a la fukutina y la proteína relacionada a la fukutina (FKRP), son enzimas que presentan similitudes con varias glicosiltransferasas y muestran en su extremo C-terminal la secuencia ASP-XAA-ASP, la cual representa un dominio funcional muy conservado en la familia de las glicosiltransferasas.<sup>27</sup> Aunque no se conoce la función de la fukutina, se propone que actúa como chaperona para modificar la actividad de POMGnT1, debido a que existe interacción entre ambas proteínas. Por su parte, DPM1, DPM2, DPM3, DOLK y GMPPB están involucradas en la síntesis de Dol-P-Manosa, un donador de manosa esencial para la O-manosilación, N-glicosilación, C-manosilación y para la formación de la molécula de anclaje glicosil fosfatidilinositol (GPI).<sup>28</sup> Finalmente, TMEM5 tiene un dominio de glicosiltransferasa, mientras que ISPD posee un dominio isoprenoide característico de las transferasas de di-nucleótidos de azúcar; se cree que ambas enzimas participan en la glicosilación del  $\alpha$ -DG (Figura 2).<sup>29</sup>

## Distroglicanopatías secundarias

Las distroglicanopatías constituyen un grupo de enfermedades genéticas autosómicas recesivas que, aunque se originan por mutaciones en diferentes genes, tienen una etiología común: la alteración de la función del  $\alpha$ -DG. Las distroglicanopatías primarias se originan por mutaciones homocigotas en el gen del distroglicano, *DAG1*, mientras que las distroglicanopatías secundarias se deben a mutaciones en los genes que codifican para las glicosiltransferasas *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *LARGE*, *FKTN* y *FKRP*, o en los genes que codifican para otras enzimas encargadas del proceso de glicosilación del  $\alpha$ -DG, incluyendo

*ISPD*, *GDTC2*, *B3GNT1*, *B3GALNT2*, *DPM1*, *DPM2*, *DPM3*, *DOLK* y *TMEM5* (Cuadro I).<sup>31,32</sup>

La deficiencia del  $\alpha$ -DG o la hipoglicosilación en la proteína daña la unión de la matriz extracelular con el citoesqueleto de actina, generando inestabilidad en el sarcolema, lo que conlleva a infiltración de miofibras, debilidad muscular, retraso en la migración neuronal y, finalmente, la manifestación final de la distrofia muscular, acompañada con afectaciones del sistema nervioso central (SNC) y daño ocular.<sup>30,58</sup>

Las distroglicanopatías descritas hasta ahora son el síndrome de Walker-Warburg (WWS), el desorden muscular músculo-ojos-cerebro (MEB), la distrofia muscular congénita de Fukuyama (FCMD), las distrofias musculares congénitas 1C y 1D (MDC1C y MDC1D) y la distrofia muscular de cinturas (LGMD).<sup>30,59</sup>

## Síndrome de Walker-Warburg (WWS)

El WWS es la distroglicanopatía más severa, ya que los pacientes tienen un rango de vida que va desde algunas horas hasta los cinco años de edad. El WWS es una distrofia muscular congénita que se caracteriza por malformaciones oculares y anomalías cerebrales (Cuadro II). A nivel molecular, existe hipoglicosilación del  $\alpha$ -DG y bajos niveles de la proteína en el músculo esquelético y nervio periférico. Los primeros genes identificados como causantes del WWS fueron *POMT1* y *POMT2*, los cuales codifican para enzimas que inician la vía de la O-glicosilación del  $\alpha$ -DG (Figura 2).<sup>33,35</sup> Recientemente, se describieron mutaciones en los genes *FKTN*, *FKRP*, *B3GNT1*, *TMEM5* y *ISPD* que originan también el fenotipo del WWS;<sup>29,40,47,48,50,60</sup> sin embargo, no se conoce aún en qué paso de la vía de la O-glicosilación del  $\alpha$ -DG participan las proteínas respectivas. De manera interesante, se reportó recientemente que un paciente con el WWS presentó eliminación del gen *DAG1* (c.743C>del) (Cuadro I).<sup>56</sup>

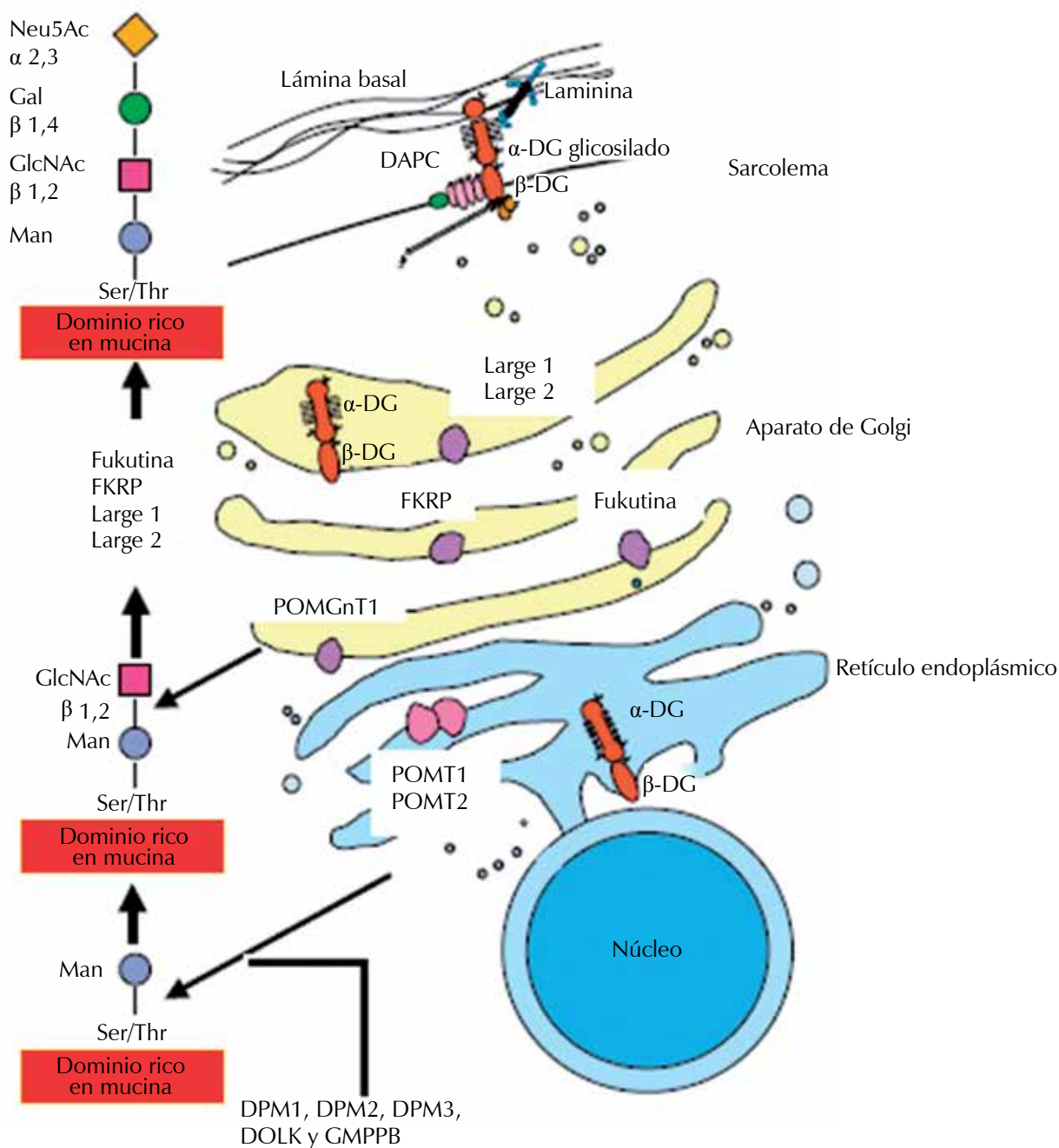
## Desorden muscular músculo-ojos-cerebro (MEB)

Es una distrofia muscular congénita con herencia autosómica recesiva que se caracteriza por anomalías oculares (miopía congénita, glaucoma e hipoplasia retinal), retraso mental y malformaciones estructurales del cerebro (Cuadro II). La mayoría de estos pacientes pertenecen a la población finlandesa,<sup>38</sup> aunque también se han identificado individuos afectados en Japón y Corea.<sup>61</sup> Mutaciones en el gen *POMGnT1* causan esta distroglicanopatía. Este gen codifica para la enzima O-manosa  $\beta$ -1, 2-N-acetilglucosaminil trans-



ferasa 1, la cual cataliza la transferencia de residuos de N-acetilglucosamina a O-manosa glicanos en la vía de glicosilación del  $\alpha$ -DG (Cuadro I); por lo tanto, mutaciones en este gen causan la hipoglicosilación del  $\alpha$ -DG, lo que a su vez impide la unión de esta proteína con la laminina y, finalmente, la conexión de la matriz extracelular con el citoesqueleto de actina.

Los pacientes con MEB presentan niveles disminuidos del  $\alpha$ -DG y la laminina.<sup>36,38</sup> De manera interesante, se ha observado que la mayoría de los pacientes con distrofia muscular leve presentan una mutación situada hacia el extremo 3' del gen *POMGnT1*, mientras que los pacientes con fenotipo severo tienen mutaciones en el extremo 5' del gen.<sup>61</sup>



**Figura 2.** Ruta enzimática de la glicosilación del  $\alpha$ -distroglicano (modificado de [30]).

### ***Distrofia muscular congénita de Fukuyama (FCMD)***

Es una enfermedad con herencia autosómica recesiva que presenta su mayor prevalencia en Japón, con una incidencia de 1 en 10,000 recién nacidos. La distrofia muscular es severa y va acompañada por migración neuronal anormal, retraso mental, epilepsia, lisencefalia y, frecuentemente, anomalías oculares (*Cuadro II*). La mayoría de los pacientes presentan una inserción de un retrotransposón de 3kb en la región 3' no codificante del gen *FKTN*, lo que ocasiona una disminución en los niveles del RNAm de la fukutina (*Cuadro I*).<sup>39,62</sup> De manera interesante, se identificaron dos pacientes de origen turco que portan mutaciones nulas homocigotas en el gen *FKTN*, lo que implica que

la vida humana es compatible con la ausencia de esta proteína. Los pacientes presentan un fenotipo más parecido al del WWS que al de la FCMD.<sup>63</sup>

### ***Distrofias musculares congénitas 1C y 1D (MDC1C y MDC1D)***

La distrofia muscular congénita tipo 1C (MDC1C) se presenta en etapas tempranas, se caracteriza por debilidad muscular severa, cardiomiopatía, anomalías oculares, retraso en la migración neuronal, con o sin retraso mental. Mutaciones en el gen *FKRP* que codifican para la proteína relacionada a la fukutina son las causantes de esta distrofia muscular.<sup>42</sup>

La distrofia muscular congénita tipo 1D (MDC1D), se caracteriza por una distrofia muscular severa, retraso

**Cuadro I.** Genes involucrados en las distroglicanopatías.

Distroglicanopatía	Gen	Función proteína	Ref.
WWS/LGMD2K	<i>POMT1</i>	O-manosil-transferasa 1	33,34
WWS/LGMD2N	<i>POMT2</i>	O-manosil-transferasa 2	34,35
MEB/LGMD2O	<i>POMGNT1</i>	O-manosa β1, 2-N-acetilglucosaminil-transferasa	36-38
FCMD/WWS/LGMD2M	<i>FKTN</i>	Función desconocida	39-41
WWS/MEB/MDC1C/ LGMD21	<i>FKRP</i>	Función desconocida	42-44
MDC1D	<i>LARGE</i>	β1, 3-GlcA y α1, 3-Xyl-transferasa	25-45
WWS	<i>GTDC2/B3GALNT2</i>	β1, 3-N-acetilgalactosaminil-transferasa 2	46,47
WWS	<i>TMEM5</i>	Proteína transmembranal 5	29
WWS	<i>B3GNT1</i>	β1, 2-N-acetilglucosaminil-transferasa 1	48
CMD/LGMD	<i>GMPPB</i>	GDP-manosa pirofosforilasa B	49
WWS	<i>ISPD</i>	Función desconocida	29,50
CMD	<i>DPM1</i>	Dolicol-fosfato manosil-transferasa 1	28,51
CMD, hipoplasia cerebelar	<i>DPM2</i>	Dolicol-fosfato manosil-transferasa 2	52
LGMD2I	<i>DPM3</i>	Dolicol-fosfato manosil-transferasa 3	53
CMD, Cardiomiopatía	<i>DOLK</i>	Dolicol cinasa	54
WWS, MEB, LGMD	<i>DAG1</i>	Distroglicano	55-57

WWS = Síndrome de Walker-Warburg, MEB = Desorden muscular músculo-ojos-cerebro, FCMD = Distrofia muscular congénita de Fukuyama, MDC1C, MDC1D = Distrofia muscular congénita tipos 1C y 1D, CMD = Distrofia muscular congénita, LGMD = Distrofia muscular de cinturas.

mental, cambios en la materia blanca, anomalías estructurales en el cerebro y retraso en la migración neuronal. La mutación responsable de MDC1D es una

mutación heterocigota c.G1525A (p.Glu509Lys) en el exón 13 y una inserción de un par de bases c.1999insT en el exón 15 del gen *LARGE* (Cuadros I y II).<sup>64</sup>

**Cuadro II.** Principales categorías fenotípicas de las distroglicanopatías propuestas por Godfrey et al, 2007 (Modificado de 66).

Clasificación fenotípica		Descripción clínica
Desarrollo de la enfermedad en etapas tempranas	WWS	Su aparición es prenatal o en el nacimiento. Los pacientes tienen anomalías severas en la estructura cerebral, incluyendo agiria o lisencefalia severa con plegamientos corticales rudimentarios, hidrocefalia marcada, daño cerebelar severo y ausencia parcial o total del <i>corpus callosum</i> . Las anomalías oculares, incluyendo cataratas congénitas, microftalmia y buftalmia, son comunes. El desarrollo motor se encuentra muy dañado y la mayoría de los pacientes controlan únicamente los movimientos de la cabeza.
	MEB/FCMD	En esta categoría se ubican dos distroglicanopatías que comparten características fenotípicas. Presentan distrofia muscular congénita (DMC) y defectos en la estructura cerebral menos severos que aquéllos que se observan en el WWS. Por medio de imagenología de resonancia magnética se observa paquigiria, la cual involucra principalmente la zona frontoparietal, polimicrogria, hipoplasia cerebelar, displasia cerebelar y aplanamiento del puente de barolio y tronco cerebral. Las anomalías oculares presentes incluyen glaucoma congénito, miopía progresiva, atrofia retinal y cataratas juveniles. Los individuos rara vez caminan y sólo pronuncian algunas palabras.
	CMD con afectación cerebelar	Los pacientes con distrofia muscular congénita con retraso mental presentan daño cerebelar como la única anomalía estructural cerebral evidenciada por RMI. Las anomalías cerebelares pueden incluir quistes, hipoplasia o displasia. Los quistes cerebelares en ausencia de materia blanca supratentorial o involucramiento cortical han sido encontrados con mayor frecuencia en pacientes con defectos en <i>FKRP</i> o <i>POMTGNT1</i> .
	CMD con retraso mental	Distrofia muscular congénita. Estructura del cerebro normal, pero presencia de retraso mental. Pacientes con microcefalia aislada o cambios menores en la materia blanca.
Desarrollo de la enfermedad en etapas tardías	CMD sin retraso mental	Desarrollo cognitivo normal; se incluyen pacientes que no han sido sometidos a neuroimagenología.
	LGMD con retraso mental	Presencia de retraso mental sin anomalías estructurales del cerebro. Se incluyen pacientes con microcefalia aislada o cambios menores en la materia blanca. Se incluye la LGMD2K.
	LGMD sin retraso mental	LGMD sin retraso mental, incluyendo LGMD2I y LGMD2L.

WWS = Síndrome de Walker-Warburg, MEB = Desorden muscular músculo-ojos-cerebro, FCMD = Distrofia muscular congénita de Fukuyama, MDC1C, MDC1D = Distrofia muscular congénita tipos 1C y 1D, CMD = Distrofia muscular congénita, LGMD = Distrofia muscular de cinturas.

## ***Distrofia muscular de cinturas (LGMD)***

Son un grupo heterogéneo de distrofias musculares que se clasifican en LGMD autosómicas dominantes (LGMD1) y LGMD autosómicas recesivas (LGMD2). Pueden presentarse a edades tempranas (neonatos, niños), durante la adolescencia o a edades tardías (adultos). Se caracterizan por afectar los músculos de la pelvis (cintura pelviana) y los músculos de los hombros (cintura escapular), ocasionando debilidad de los mismos. Los pacientes también presentan cardiomiopatías y pueden presentar o no retraso mental.<sup>65</sup>

En el caso de las distroglicanopatías que dan lugar a fenotipos con características de LGMD, todas son de carácter autosómico recesivo. Dentro de los genes involucrados en la vía de glicosilación del  $\alpha$ -distroglicano que producen este tipo de distrofias musculares están *POMT1* (LGMD2K), *POMT2* (LGMD2N), *POMGnT1* (LGMD2O), *FKTN* (LGMD2M), *FKRP* (LGMD2I) y *DAG1* (LGDM) (Cuadros I y II).<sup>34,37,41,43,55</sup>

A nivel clínico, las distroglicanopatías se dividen en siete categorías, de acuerdo con la edad de aparición y severidad del daño muscular, y el grado de afectación de la estructura y función cerebral (Cuadro II).<sup>59</sup>

## **Distroglicanopatías primarias**

### ***Mutaciones en el gen DAG1***

Solamente se han descrito en pacientes tres mutaciones puntuales homocigotas en el gen *DAG1*, las cuales se describen a continuación.

#### ***MUTACIÓN PUNTUAL HOMOCIGOTA c.575C>T***

En el 2011, se reportó el primer paciente con una mutación puntual en el gen *DAG1*, (c.575C>T), la cual genera la sustitución de una treonina por una metionina en el aminoácido 192 (p.Treo192Met) dentro del dominio el N-terminal del  $\alpha$ -DG. Esta treonina está conservada entre especies y se piensa que es necesaria para la interacción del  $\alpha$ -DG con LARGE. La mutación provoca que la O-glicosilación del  $\alpha$ -DG sea ineficiente, generándose una distrofia muscular tipo LGMD con deterioro cognitivo.<sup>55</sup>

#### ***MUTACIÓN PUNTUAL HOMOCIGOTA c.2006G>T***

En el 2013, se identificaron dos hermanas que presentan una mutación puntual homocigota (c.2006G>T) en el gen *DAG1*, en la región que

codifica para el dominio extracelular del  $\beta$ -DG. La mutación ocasiona la sustitución p.Cys669Phe, generando una distroglicanopatía con fenotipo parecido al desorden de músculo-ojos-cerebro (MEB), que es acompañada por leucodistrofia multicística. Se cree que la sustitución de la cisteína 669 desestabiliza un puente disulfuro implicado en la interacción del  $\beta$ -DG con el  $\alpha$ -DG, lo que, en consecuencia, alteraría la conexión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina.<sup>57</sup>

#### ***DELECIÓN HOMOCIGOTA c.743C>DEL***

En el 2015, se reportaron cinco pacientes de una misma familia que presentan una delección homocigota de un par de bases (c.743C>DEL) en el gen *DAG1*, la cual ocasionó un corrimiento en el marco de lectura y la introducción de un codón de paro, impidiéndose la síntesis de ambas proteínas,  $\alpha$ -DG y  $\beta$ -DG.<sup>56</sup> De manera interesante, la ausencia del distroglicano no interrumpió el desarrollo embrionario, como se ha descrito en el ratón.<sup>19</sup> Los pacientes presentaron el síndrome WWS con calcificaciones intracraneales y fallecieron entre la edad de unas cuantas horas y los tres meses y medio debido a paro respiratorio.

Es importante resaltar que los ocho pacientes que han presentado mutaciones en el gen *DAG1* son de sexo femenino, lo que sugiere que estas mutaciones son letales desde el desarrollo embrionario en los hombres.

## **Modelos animales para el estudio de las distroglicanopatías**

El avance biotecnológico acelerado de los últimos 15 años ha permitido el desarrollo de diferentes metodologías para generar modelos animales de una gran variedad de enfermedades humanas, incluyendo el cultivo y manipulación de células embrionarias, la utilización de vectores virales y, recientemente, el sistema CRISPR (por sus siglas en inglés: *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*); este último permite editar el genoma en regiones precisas para *noquear* o modificar genes de interés. Los modelos animales son de gran utilidad para conocer la función de los genes en su estado normal y patológico, así como para experimentar terapias basadas en fármacos, células o genes.

A continuación se describen los modelos animales que se han desarrollado para el estudio de las distroglicanopatías.



## Modelos en ratón

### MUTACIONES EN EL GEN *DAG1*

La ausencia de distroglicanos en ratones nulos es letal en etapas embrionarias debido a defectos en las etapas tempranas del ensamblaje de la membrana basal.<sup>19</sup> Sin embargo, a través de la tecnología Cre-LoxP, se han generado modelos condicionales de silenciamiento tejido-específico del distroglicano. La eliminación del gen *DAG1* en el músculo esquelético de ratón produjo un fenotipo distrófico leve, ya que las células satélites conservan la capacidad de expresar el distroglicano y, de esta manera, regeneran fibras musculares.<sup>67</sup> Sin embargo, la eliminación del distroglicano del SNC produjo un fenotipo similar al de las patológicas WWS, MEB, FCMD y al del ratón *Large<sup>myd</sup>*, el cual presenta daño en las capas corticales, fusión de hemisferios cerebrales y migración aberrante de células de la gránula (ver la siguiente sección, párrafo dos).<sup>68</sup> Por otro lado, se generó un ratón que porta la mutación p.Treo192Met, la cual genera manifestaciones leves de LGMD en el humano. Este ratón desarrolla un fenotipo de distrofia muscular con deterioro funcional del SNC, pero sin aparentes malformaciones estructurales del cerebro.<sup>55</sup>

### MUTACIONES EN LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LAS GLICOSILTRANSFERASAS

Ratones nulos para los genes de *fukutina* y *POMT1* son letales en etapas embrionarias tempranas debido al daño que causan sobre la membrana basal.<sup>69,70</sup> En contraste, el ratón quimérico deficiente de *fukutina*, generado a través de células madre embrionarias (ES), presenta un fenotipo similar al del WWS.<sup>71</sup>

El ratón *Large<sup>myd</sup>*, el cual pierde la función del gen *Large*, desarrolla un fenotipo similar a la distrofia muscular congénita de Fukuyama (FCMD) y la enfermedad del músculo-ojo-cerebro (MEB); va acompañado, además, por anomalías oculares y defectos de migración neuronal. El modelo murino de MYD se ha utilizado para estudiar la función de la glicosilación del  $\alpha$ -DG en el músculo, el cerebro y la retina.<sup>72</sup> Finalmente, se han generado dos ratones nulos para el gen *PomGnT1*; ambos modelos presentan un fenotipo similar que consiste en miopatía, glicosilación aberrante del distroglicano y anomalías en el SNC.<sup>73</sup>

## Modelos en el pez cebra

El modelo del pez cebra ha representado una alternativa muy útil para el estudio de las distroglicanopatías,

ya que los genes involucrados en este grupo de patologías están conservados entre el humano y el pez cebra. Además, para estudios de desarrollo embrionario, el pez cebra posee una ventaja notable: el embrión es translúcido y tiene una proporción elevada de tejido muscular. Se ha documentado que este modelo es ideal para probar agentes terapéuticos potenciales y analizar sus efectos a nivel genético a gran escala.<sup>74</sup>

### MUTACIONES EN EL GEN *DAG1*

A través de un mapeo genético, se identificó un ortólogo del gen *DAG1* en el pez cebra. De manera interesante, la introducción de una mutación puntual (c.1700T> A; p.V567D) provoca el desarrollo de un fenotipo similar al de los síndromes de músculo-ojos-cerebro (MEB) y WWS. Esta mutación impide la expresión de ambos,  $\alpha$ -DG y  $\beta$ -DG, desestabilizando la conexión de la matriz extracelular con el citoesqueleto de actina. Se piensa que este modelo animal ayudará a comprender las bases moleculares de la participación del distroglicano en las distroglicanopatías.<sup>75</sup>

### MUTACIÓN EN EL GEN DE LA GLICOSILTRANSFERASA FUKUTINA

El modelo del pez cebra que presenta deficiencia de fukutina (FKRP) manifiesta anomalías musculares, neuronales y oculares.<sup>76</sup>

## Estrategias terapéuticas para combatir las distroglicanopatías

Las distroglicanopatías exhiben fenotipos severos que ocasionan en algunos casos la muerte de los pacientes poco después del nacimiento o en edades tempranas. En este escenario, el desarrollo de terapias efectivas contra las distroglicanopatías es impostergable. No obstante, la aplicación segura de tratamientos terapéuticos requiere su comprobación previa en modelos celulares y animales.

Una característica común para todas las distroglicanopatías es la hipoglicosilación del  $\alpha$ -DG; por lo tanto, las estrategias terapéuticas se han dirigido a restaurar la glicosilación de esta proteína, esperando que de esta manera el  $\alpha$ -DG recupere la capacidad para interaccionar con las proteínas de la matriz extracelular y se impida en última instancia el desarrollo de la distrofia muscular, así como de las afectaciones del cerebro y el sistema ocular. Tomando en cuenta que la enzima *LARGE* es clave en la vía de glicosilación del  $\alpha$ -DG, se analizó el efecto de la sobreexpresión de

LARGE en un modelo murino de distroglicanopatía. La sobreexpresión de LARGE restablece la glicosilación del  $\alpha$ -DG e, interesantemente, aminora el fenotipo distrófico del ratón Large<sup>myd</sup>.<sup>77</sup> En este mismo estudio, se observó que la sobreexpresión de LARGE, pero no de las glicosiltransferasas POMGnT1 y FKR, restaura la glicosilación y, por ende, la función del  $\alpha$ -DG en cultivos de células de pacientes. Estos hallazgos posicionan a LARGE como blanco terapéutico para combatir las distroglicanopatías,<sup>78,79</sup> sin embargo, se requieren estudios más profundos para descartar daños colaterales de la sobreexpresión de LARGE y examinar si las afectaciones estructurales/funcionales del cerebro se logran también revertir.

## Conclusiones

La ocurrencia de una variedad de distrofias musculares debidas a defectos en la glicosilación del  $\alpha$ -DG resalta la función crítica de esta proteína para conectar la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina, proceso esencial para el correcto funcionamiento del tejido muscular y el cerebro. La glicosilación del  $\alpha$ -DG es necesaria para que se asocie con componentes de la matriz extracelular; por lo tanto, la disección de la vía de glicosilación del  $\alpha$ -DG es un paso necesario para entender las bases moleculares de las distroglicanopatías. En este mismo sentido, se vislumbra que los esfuerzos futuros para el desarrollo de terapias contra las distroglicanopatías se enfocarán en la restauración de la glicosilación del  $\alpha$ -DG.

## Bibliografía

- Costanza L, Moggio M. Muscular dystrophies: histology, immunohistochemistry, molecular genetics and management. *Curr Pharm Des.* 2009; 16 (8): 978-987.
- Sandona D, Betto R. Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. *Expert Rev Mol Med.* 2009; 11: e28.
- Yoshida M et al. Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by n-octyl beta-D-glucoside. *Eur J Biochem.* 1994; 222 (3): 1055-1061.
- Ehmsen J, Poon E, Davies. The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Sci.* 2002; 115 (Pt 14): 2801-2083.
- Sweeney HL, Barton ER. The dystrophin-associated glycoprotein complex: what parts can you do without? *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97 (25): 13464-13466.
- Ervasti JM, Sonnemann KJ. Biology of the striated muscle dystrophin-glycoprotein complex. *Int Rev Cytol.* 2008; 265: 191-225.
- Daniele N, Richard I, Bartoli M. Ins and outs of therapy in limb girdle muscular dystrophies. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39 (9): 1608-1624.
- Bozzi M et al. Enzymatic processing of beta-dystroglycan recombinant ectodomain by MMP-9: identification of the main cleavage site. *IUBMB Life.* 2009; 61 (12): 1143-1152.
- Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell.* 1991; 66 (6): 1121-1131.
- Ibraghimov-Beskrovnaia O et al. Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum Mol Genet.* 1993; 2 (10): 1651-1657.
- Holt KH et al. Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide. *FEBS Lett.* 2000; 468 (1): 79-83.
- Talts JF et al. Binding of the G domains of laminin alpha1 and alpha2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *Embo J.* 1999; 18 (4): 863-870.
- Chung W, Campanelli JT, WW and EF hand domains of dystrophin-family proteins mediate dystroglycan binding. *Mol Cell Biol Res Commun.* 1999; 2 (3): 162-171.
- Sotgia F et al. Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta-dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J Biol Chem.* 2000; 275 (48): 38048-38058.
- Lara-Chacon B et al. Characterization of an importin alpha/beta-recognized nuclear localization signal in beta-dystroglycan. *J Cell Biochem.* 2010; 110 (3): 706-717.
- Spence HJ et al. Ezrin-dependent regulation of the actin cytoskeleton by beta-dystroglycan. *Hum Mol Genet.* 2004; 13 (15): 1657-1668.
- Bozzi M et al. Functional diversity of dystroglycan. *Matrix Biol.* 2009; 28 (4): 179-187.
- Martinez-Vieyra IA et al. A role for beta-dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1833 (3): 698-711.
- Williamson RA et al. Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice. *Hum Mol Genet.* 1997; 6 (6): 831-841.
- Endo T. Glycobiology of alpha-dystroglycan and muscular dystrophy. *J Biochem.* 2015; 157 (1): 1-12.
- Michele DE, Campbell KP. Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. *J Biol Chem.* 2003; 278 (18): 15457-15460.
- Akasaka-Manyá K et al. Physical and functional association of human protein O-mannosyltransferases 1 and 2. *J Biol Chem.* 2006; 281 (28): 19339-19345.
- Jurado LA, Coloma A, Cruces J. Identification of a human homolog of the Drosophila rotated abdomen gene (POMT1) encoding a putative protein O-mannosyltransferase, and assignment to human chromosome 9q34.1. *Genomics.* 1999; 58 (2): 171-180.

24. Takahashi S et al. A new beta-1, 2-N-acetylglucosaminyltransferase that may play a role in the biosynthesis of mammalian O-mannosyl glycans. *Glycobiology*. 2001; 11 (1): 37-45.
25. Peyrard M et al. The human LARGE gene from 22q12.3-q13.1 is a new, distinct member of the glycosyltransferase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96 (2): 598-603.
26. Kanagawa M et al. Molecular recognition by LARGE is essential for expression of functional dystroglycan. *Cell*. 2004; 117 (7): 953-964.
27. Aravind L, Koonin EV. The fukutin protein family –predicted enzymes modifying cell-surface molecules. *Curr Biol*. 1999; 9 (22): R836-R837.
28. Denecke J, Kranz C. Hypoglycosylation due to dolichol metabolism defects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2009; 1792 (9): 888-895.
29. Vuillaumier-Barrot S et al. Identification of mutations in TMEM5 and ISPD as a cause of severe cobblestone lissencephaly. *Am J Hum Genet*. 2012; 91 (6): 1135-1143.
30. Barresi R, Campbell KP. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci*. 2006; 119 (Pt 2): 199-207.
31. Muntoni F et al. Muscular dystrophies due to glycosylation defects: diagnosis and therapeutic strategies. *Curr Opin Neurol*. 2011; 24 (5): 437-442.
32. Hewitt JE. Abnormal glycosylation of dystroglycan in human genetic disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1792 (9): 853-861.
33. Beltran-Valero de Bernabe D et al. Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet*. 2002; 71 (5): 1033-1043.
34. Hafner P et al. Skeletal muscle MRI of the lower limbs in congenital muscular dystrophy patients with novel POMT1 and POMT2 mutations. *Neuromuscul Disord*. 2014; 24 (4): 321-324.
35. Van Reeuwijk J et al. POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet*. 2005; 42 (12): 907-912.
36. Yoshida A et al. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell*. 2001; 1 (5): 717-724.
37. Raducu M et al. Promoter alteration causes transcriptional repression of the POMGnT1 gene in limb-girdle muscular dystrophy type 2O. *Eur J Hum Genet*. 2012; 20 (9): 945-952.
38. Diesen C et al. POMGnT1 mutation and phenotypic spectrum in muscle-eye-brain disease. *J Med Genet*. 2004; 41 (10): e115.
39. Kobayashi K et al. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature*. 1998; 394 (6691): 388-392.
40. De Bernabe DB et al. A homozygous nonsense mutation in the fukutin gene causes a Walker-Warburg syndrome phenotype. *J Med Genet*. 2003; 40 (11): 845-848.
41. Riisager M et al. A new mutation of the fukutin gene causing late-onset limb girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2013; 23 (7): 562-567.
42. Brockington M et al. Mutations in the fukutin-related protein gene (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 (6): 1198-1209.
43. Yamamoto LU et al. Muscle protein alterations in LGMD2I patients with different mutations in the fukutin-related protein gene. *J Histochem Cytochem*. 2008; 56 (11): 995-1001.
44. Beltran-Valero de Bernabé D et al. Mutations in the FKRP gene can cause muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet*. 2004; 41 (5): e61.
45. Grewal PK et al. Characterization of the LARGE family of putative glycosyltransferases associated with dystroglycanopathies. *Glycobiology*. 2005; 15 (10): 912-923.
46. Manzini MC et al. Exome sequencing and functional validation in zebrafish identify GTDC2 mutations as a cause of Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet*. 2012; 91 (3): 541-547.
47. Shaheen R et al. A truncating mutation in B3GNT1 causes severe Walker-Warburg syndrome. *Neurogenetics*. 2013; 14 (3-4): 243-245.
48. Buysse K et al. Missense mutations in beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 1 (B3GNT1) cause Walker-Warburg syndrome. *Hum Mol Genet*. 2013; 22 (9): 1746-1754.
49. Carss KJ et al. Mutations in GDP-mannose pyrophosphorylase B cause congenital and limb-girdle muscular dystrophies associated with hypoglycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet*. 2013; 93 (1): 29-41.
50. Roscioli T et al. Mutations in ISPD cause Walker-Warburg syndrome and defective glycosylation of alpha-dystroglycan. *Nat Genet*. 2012; 44 (5): 581-585.
51. Yang AC et al. Congenital disorder of glycosylation due to DPM1 mutations presenting with dystroglycanopathy-type congenital muscular dystrophy. *Mol Genet Metab*. 2013; 110 (3): 345-351.
52. Barone R et al. DPM2-CDG: a muscular dystrophy-dystroglycanopathy syndrome with severe epilepsy. *Ann Neurol*. 2012; 72 (4): 550-558.
53. Lefeber DJ et al. Deficiency of Dol-P-Man synthase subunit DPM3 bridges the congenital disorders of glycosylation with the dystroglycanopathies. *Am J Hum Genet*. 2009; 85 (1): 76-86.
54. Lefeber DJ et al. Autosomal recessive dilated cardiomyopathy due to DOLK mutations results from abnormal dystroglycan O-mannosylation. *PLoS Genet*. 2011; 7 (12): e1002427.
55. Hara Y et al. A dystroglycan mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy. *N Engl J Med*. 2011; 364 (10): 939-946.
56. Riemersma M et al. Absence of alpha- and beta-dystroglycan is associated with Walker-Warburg syndrome. *Neurology*. 2015; 84 (21): 2177-2182.

57. Geis T et al. Homozygous dystroglycan mutation associated with a novel muscle-eye-brain disease-like phenotype with multicystic leucodystrophy. *Neurogenetics*. 2013; 14 (3-4): 205-213.
58. Cohn RD. Dystroglycan: important player in skeletal muscle and beyond. *Neuromuscul Disord*. 2005; 15 (3): 207-217.
59. Godfrey C et al. Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain*. 2007; 130 (Pt 10): 2725-2735.
60. Trkova M et al. ISPD gene homozygous deletion identified by SNP array confirms prenatal manifestation of Walker-Warburg syndrome. *Eur J Med Genet*. 2015; 58 (8): 372-375.
61. Taniguchi K et al. Worldwide distribution and broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. *Hum Mol Genet*. 2003; 12 (5): 527-534.
62. Toda T et al. The Fukuyama congenital muscular dystrophy story. *Neuromuscul Disord*. 2000; 10 (3): 153-159.
63. Silan F et al. A new mutation of the fukutin gene in a non-Japanese patient. *Ann Neurol*. 2003; 53 (3): 392-396.
64. Longman C et al. Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Hum Mol Genet*. 2003; 12 (21): 2853-2861.
65. Nigro V, Aurino S, Piluso G. Limb girdle muscular dystrophies: update on genetic diagnosis and therapeutic approaches. *Curr Opin Neurol*. 2011; 24 (5): 429-436.
66. Godfrey C et al. Dystroglycanopathies: coming into focus. *Curr Opin Genet Dev*. 2011; 21 (3): 278-285.
67. Cohn RD et al. Disruption of DAG1 in differentiated skeletal muscle reveals a role for dystroglycan in muscle regeneration. *Cell*. 2002; 110 (5): 639-648.
68. Moore SA et al. Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Nature*. 2002; 418 (6896): 422-425.
69. Kurahashi H et al. Basement membrane fragility underlies embryonic lethality in fukutin-null mice. *Neurobiol Dis*. 2005; 19 (1-2): 208-217.
70. Willer T et al. Targeted disruption of the Walker-Warburg syndrome gene *Pomt1* in mouse results in embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101 (39): 14126-14131.
71. Takeda S et al. Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histiogenesis and normal eye development. *Hum Mol Genet*. 2003; 12 (12): 1449-1459.
72. Holzfeind PJ et al. Skeletal, cardiac and tongue muscle pathology, defective retinal transmission, and neuronal migration defects in the *Large(myd)* mouse defines a natural model for glycosylation-deficient muscle-eye-brain disorders. *Hum Mol Genet*. 2002; 11 (21): 2673-2687.
73. Liu J et al. A genetic model for muscle-eye-brain disease in mice lacking protein O-mannose 1, 2-N-acetylglucosaminyltransferase (*POMGnT1*). *Mech Dev*. 2006; 123 (3): 228-240.
74. Bassett DI, Currie PD. The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. *Hum Mol Genet*. 2003; 12 Spec 2: R265-270.
75. Gupta V et al. The zebrafish *dag1* mutant: a novel genetic model for dystroglycanopathies. *Hum Mol Genet*. 2011; 20 (9): 1712-1725.
76. Kawahara G et al. Zebrafish models for human FKRP muscular dystrophies. *Hum Mol Genet*. 2010; 19 (4): 623-633.
77. Inamori K et al. Dystroglycan function requires xylosyl- and glucuronyltransferase activities of LARGE. *Science*. 2012; 335 (6064): 93-96.
78. Barresi R et al. LARGE can functionally bypass alpha-dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. *Nat Med*. 2004; 10 (7): 696-703.
79. Hewitt JE. LARGE enzyme activity deciphered: a new therapeutic target for muscular dystrophies. *Genome Med*. 2012; 4 (3): 23.