

Facultad de
Medicina

Departamento
de
Bioquímica

**SÍNDROME DE WALKER WARBURG:
GENES IMPLICADOS. ESTUDIOS FUNCIONALES
EN ENFERMOS**



TESIS DOCTORAL

M^a del Rocío
Peña Cotarelo

Madrid 2008

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**SÍNDROME DE WALKER-WARBURG:
GENES IMPLICADOS. ESTUDIOS FUNCIONALES
EN ENFERMOS**

Memoria que presenta, para optar al grado de Doctora
por la Universidad Autónoma de Madrid, la licenciada en Biología por la

Universidad de Sevilla

M^a del Rocío Peña Cotarelo

Director de Tesis

Jesús Cruces Pinto

Profesor Titular de la Universidad Autónoma
de Madrid

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 2008



Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica

D. **Jesús Cruces Pinto**, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica

CERTIFICA:

Que Doña **M^a del Rocío Peña Cotarelo**, licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo mi dirección, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid / Instituto de Investigaciones Biomédicas del CSIC el trabajo titulado:

SÍNDROME DE WALKER-WARBURG:
GENES IMPLICADOS. ESTUDIOS FUNCIONALES
EN ENFERMOS

Una vez supervisado el trabajo, estoy de acuerdo con los métodos empleados y avalo los resultados obtenidos, y asimismo considero que reúne todos los requisitos necesarios en cuanto a originalidad y calidad para ser presentado como Tesis Doctoral con el objeto de optar al título de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste a todos los efectos firmo el presente certificado en,

Madrid, 24 de Enero de 2008

Fdo.: Jesús Cruces Pinto

Director de la Tesis

A mi família

NO TE DETENGAS

No dejes que termine el día sin haber crecido un poco, sin haber sido feliz, sin haber aumentado tus sueños. NO TE DEJES VENCER POR EL DESALIENTO. No permitas que nadie te quite el derecho a expresarte, que es casi un deber. No abandones las ansias de hacer de tu vida algo extraordinario. No dejes de creer que las palabras y las poesías sí pueden cambiar el mundo. Pase lo que pase nuestra esencia está intacta. Somos seres llenos de pasión. La vida es desierto y oasis. Nos derriba, nos lastima, nos enseña, nos convierte en protagonistas de nuestra propia historia. Aunque el viento sople en contra, la poderosa obra continúa; tú puedes aportar una estrofa. No dejes nunca de soñar, porque en sueños es libre el hombre

Walt Witman

*Una brizna de hierba dijo a una hoja caída de un árbol en otoño:
-¡Cuanto ruido haces al caer! Espantas todos mis sueños de invierno.*

*La hoja replicó indignada:
-¡Tú, nacida en lo bajo y habitante de lo bajo, eres insignificante e incapaz de
cantar! ¡Tú no vives en las alturas y no puedes reconocer el sonido de una
canción!*

*La hoja de otoño cayó en tierra y se durmió. Y cuando llegó la primavera
despertó nuevamente de su sueño y era una brizna de hierba.
Y cuando llegó el otoño, y fue presa de su sueño invernal, flotando en el aire
empezaron a caerle las hojas encima. Murmuró para sí misma:*

*-¡Oh, estas hojas de otoño! ¡Hacen tanto ruido! ¡Espantan todos mis sueños de
invierno!*

Gibran Khalil

*No hay nada imposible para quien sabe esperar,
no importa si te has caído vuelve a levantar,
de pronto la vida brinda una oportunidad,
tu oportunidad*

Taxi

Agradecimientos



To heal the flesh the spirit must soar

Cuanto han cambiado las cosas desde que me vine a Madrid a hacer la tesis. Supongo que las cosas nunca salen como las habías planeado, pero madre mía, que grandes cambios han sucedido, aunque al final, poniéndolo todo sobre una balanza, puedo afirmar que el resultado ha sido muy positivo. Nunca pensé que diría esto cuando llegué pero me da un poco de pena irme.

Madre mía, Oh my god!!! Por dónde empezar. Supongo que es imposible desarrollar una tesis doctoral sin la colaboración de cuantos tienes a tu alrededor. Así que, en primer lugar, debo agradecer a Jesús por ofrecerme la oportunidad de realizar mi tesis en su laboratorio, y por ayudarme en innumerables ocasiones, tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias por preocuparte tanto por nosotras y por nuestro bienestar... y sobre todo gracias por mantener nuestros niveles de glucosa siempre en su punto.. que viva el chocolate! Ea, ya por fin te libras de mí, una boca menos que alimentar. A mis primeras compañeras de labo, Belén y Almudena, con las que he pasado muchas, muchísimas horas de risas en el laboratorio y que me han ayudado y enseñado en todo momento; juntas podríamos escribir un libro llamado “cagadas del B17” que sería todo un *best-seller*.

A mis actuales compis y amigas, Oihane, Madalina, Patricia y Almudena “la nuestra”. Juntas hemos trabajado, comido, dormido, cantado (más bien, desafinado), conocido otras ciudades y otros paisajes. Gracias por aguantarme este último año neurótico y ayudarme también no sólo en el laboratorio sino a seguir adelante cuando creía que ya no podía más...en especial gracias a Oihane por ayudarme tantísimo con los experimentos, con el dichoso “paper”, con la tesis...no sé que hubiera hecho sin tí petarda. Que sepas que espero verte con una bata de cola en la Feria de Sevilla! A Leti por venir a animarme con su sonrisa y sus maravillosos abrazos cada minuto de cada día (churri, eres la mejó... I love u too), y a Esther por brindarme su ayuda cada vez que la he necesitado y por ser un soplo de alegría. A “el Dioni”... tú ya sabes quién eres eh Mr. David? Por ayudarme con los odiosos datos estadísticos y por hacernos reír tantísimo en los desayunos...a ver si te quitas ya el bivi. En general, y sintiendo generalizar me gustaría

agradecer a todos los miembros, presentes y pasados de los laboratorios del departamento de Bioquímica, en especial al B15, B18 y B19 (sois muchos para nombraros a todos) por prestarme reactivos, protocolos, responder a mis innumerables dudas... sin toda esta gran colaboración que me ha sacado de incontables apuros no sé que habría hecho chicos, gracias. A los chicos de imagen y de informática (que majos que sois) y a las chicas del confocal por aguantarme infinitas horas. A Carmen Valero, porque siempre nos ha ayudado, y a nuestros “colaboradores”, Antonio, Oscar y Adriana por estar siempre dispuestos a echar una mano. A todos aquellos que han pasado por el laboratorio como técnicos o estudiantes para ayudarnos y aprender: Eva García, Eva Barroso, Caridad, Paula, Raúl, Bea y Cristina, gracias por vuestra ayuda y por amenizar nuestros días.

A mis compañeros de piso pasados y presentes Elena, Natalia, Silvia y Pedro por aguantarme a lo largo de los años y no matarme cuando me pongo de los nervios. Especialmente a Silvia, que es como mi familia aquí en Madrid..no te preocupes Silvi, al final conseguiremos ir a Moscú! A mis amigas de Sevilla, especialmente a Noemí y a Rebeca, porque aunque estuviese lejos, siempre han contado conmigo. A mi amiga Elena (mi amparo preferida) por aguantar todas mis neuras y animarme siempre. ¿Cuántas horas habremos pasado al teléfono? A mi prima María, porque a pesar de nuestros momentos malos, has estado ahí siempre, que yo lo sé pri. A mi mejor amigo, Fernando... no tengo palabras para expresar lo que siento por ti, tú ya lo sabes.

Y sobre todo y muy especialmente a mi familia, por apoyarme durante todo este trayecto, en los momentos buenos y en los malos, porque aunque desde la distancia, jamás me he sentido lejos de vosotros, y os llevo en mi corazón. Mami, aunque te diga mil veces lo pesada que eres, sabes que te quiero. Quisiera mencionar especialmente a mi madrina, mi tía Manoly, gracias tita, nunca podré agradecerte lo que has hecho por mí. Y a raíz de esto, al personal del Hospital Virgen de Rocío, porque gracias a ellos estoy aquí y por ser siempre tan comprensivos con mi particular situación de “esque estoy haciendo la tesis en Madrid”.

En fin, final de la tarea. Sabed que entre todos me habéis ayudado a cumplir la máxima que me había propuesto y que al final, he conseguido... no sin esfuerzo. Pero como dice Walt Witman “No te dejes vencer por el desaliento...” frase que me ha ayudado a lo largo de estos últimos meses, no me he dejado vencer y aquí estoy. Y como de buen nacido es ser agradecido, gracias otra vez a todos.

*Cuando estés en aguas profundas,
aprende a bucear*

Resumen/Summary

RESUMEN

El síndrome de Walker-Warburg (WWS) es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por malformaciones cerebrales, oculares y distrofia muscular, que presenta una amplia heterogeneidad genética. Hasta la fecha, se han descrito cinco genes responsables del WWS, a pesar de lo cual existen muchos enfermos en los que aún no se conoce el gen causante de la enfermedad. Los cinco genes citados están relacionados con la glicosilación de proteínas, y se ha comprobado que pueden originar otras enfermedades de carácter más leve dependiendo de las mutaciones que tengan lugar en ellos. Estas enfermedades han sido designadas alfa-distroglucanopatías ya que todas implican hipoglicosilación del α -distroglicano. La distrofia muscular congénita tipo Fukuyama, la enfermedad músculo-ojo-cerebro, la distrofia muscular congénita tipo 1D y la distrofia muscular de anillo óseo tipo 2K son algunas de estas enfermedades cuyos síntomas muestran similitudes con los del WWS, por lo que la investigación realizada en todas estas patologías supone un avance común. En este trabajo se determinan las bases moleculares del WWS en pacientes, encontrándose mutaciones en dos de los cinco genes anteriormente mencionados, el gen *POMT1* y el gen de la *fukutina*. El estudio de estos pacientes ha permitido apreciar dos posibles efectos fundadores, uno para el gen *POMT1* y otro para el gen de la *fukutina*. Adicionalmente se ha realizado un estudio en células inmortalizadas de un enfermo de WWS, en las que se observa un comportamiento anómalo del α -distroglicano, proteína cuyo correcto funcionamiento es fundamental durante el desarrollo embrionario y también en tejidos adultos, sobre todo en el músculo y en el cerebro.

SUMMARY

Walker-Warburg syndrome (WWS) is an autosomal recessive disorder characterized by brain anomalies, eye malformations and muscular dystrophy. So far, five genes responsible for this condition have been described, confirming the genetic heterogeneity. However, the gene responsible for the WWS phenotype has only been found in a minority of patients. The aforementioned genes are involved in protein glycosylation. They can give rise to milder diseases depending on the mutations that occur. Since all these diseases involve the hypoglycosylation of α -dystroglycan they have been designated alpha-dystroglycanopathies. Fukuyama type congenital muscular dystrophy, muscle-eye-brain disease, congenital muscular dystrophy type 1D and limb-girdle muscular dystrophy type 2K share symptoms with WWS, so the research advances made are a common achievement. This work resumes the molecular studies made to identify mutations in WWS patients. Two of the aforementioned genes have been found to be involved: the *POMT1* gene and in the *fukutin* gene. Besides, two possible founder effects have been identified: one for the *POMT1* gene and one for the *fukutin* gene. Additionally, studies in immortalized cells of a WWS patient shed light on the behavior of α -dystroglycan, a protein whose proper functioning is critical during embryonic development and in the adult tissues, particularly muscle and brain.

Índice

ABREVIATURAS	25
INTRODUCCIÓN	31
1. EL SÍNDROME DE WALKER-WARBURG	33
1.1. Descripción y patologías relacionadas.....	33
1.2. Bases moleculares del WWS. Heterogeneidad genética.....	34
2. EL GEN POMT1 Y LA O-MANOSILACIÓN	35
2.1. N-glicanos y O-glicanos.....	35
2.2. O-manosilglicanos.....	36
2.3. Las proteínas O-manosiltransferasas y el α -dístroglicano	38
2.4. Ortólogos del gen <i>POMT1</i>	39
2.5. Heterogeneidad fenotípica	40
3. DISTROGLICANO Y COMPLEJO GLICOPROTEICO DE UNIÓN A DISTROFINA. ALFA-DISTROGLICANOPATÍAS ..	42
3.1. El dístroglicano	43
3.2. El complejo glicoproteico de unión a dístrofina (DGC)	43
3.3. Hipoglicosilación del α -DG. Alfa-dístroglicanopatías.....	45
4. EL GEN DE LA FUKUTINA	46
4.1. Desde FCMD hasta WWS.....	46
4.2. Gen de función desconocida. Posibles funciones de la fukutina	47
4.3. Heterogeneidad fenotípica. Gen causante de alfa-dístroglicanopatías	48
5. OTROS GENES IMPLICADOS EN EL WWS	50
5.1. El gen <i>POMT2</i>	50
5.2. El gen <i>FKRP</i>	51
5.3. El gen <i>LARGE</i>	51
OBJETIVOS	55
MATERIALES Y MÉTODOS	59
1. SUJETOS. DATOS FAMILIARES Y CLÍNICOS	61
1.1. Familia 1	61
1.2. Familia 2	61
1.3. Familia 3	61
1.4. Familia 4	62
1.5. Familia 5	62
1.6. Familia 6	63
1.7. Familia 7	64

2. ANÁLISIS MOLECULAR DE GENES CANDIDATOS:	68
2.1. Elección de genes candidatos	68
2.2. Extracción de material genético.....	68
2.3. Transcripción de RNA total a cDNA. RT-PCR	69
2.4. Amplificación mediante PCR.....	69
2.5. Cebadores empleados para la amplificación y secuenciación	70
2.6. Secuenciación directa.....	71
2.7. Análisis de endonucleasas de restricción	71
2.8. Ensayo de Southern blot	71
2.8.1. Preparación y marcaje de las sondas.....	71
2.8.2. Digestión mediante endonucleasas de restricción y transferencia a membranas	72
2.9. Análisis mediante MLPA (Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación)	73
2.10. Cuantificación de la expresión del gen de la <i>fukutina</i> . RT-PCR cuantitativa.....	73
3. ANATOMÍA PATOLÓGICA. ESTUDIO PROTEICO	74
3.1. Extracción de proteína total de tejidos y células.....	74
3.2. Ensayo de Western blot	75
3.2.1. Laminin Overlay (Revestimiento con laminina)	75
3.3. Ensayo de inmunofluorescencia en células	76
3.4. Ensayo de inmunofluorescencia en tejidos.....	77
3.5. Anticuerpos primarios.....	77
3.6. Anticuerpos secundarios	78
4. CULTIVOS CELULARES	79
4.1. Líneas celulares utilizadas	79
4.1.1. Línea celular de linfoblastos inmortalizados.	79
4.1.2. Línea celular C2C12 (mioblastos murinos)	80
4.1.3. Línea celular SH-SY5Y (neuroblastos humanos)	80
4.2. Aislamiento del α -dístroglicano del medio de cultivo celular	80
4.3. Transfección de linfoblastos con el dístroglicano.....	81
4.3.1. Construcciones plasmídicas	81
4.3.2. Transfección de otros tipos celulares	84
5. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	84
5.1. Elección de las mutaciones y diseño de cebadores	85
5.2. Mutagénesis mediante PCR	87
5.3. Transfección de los plásmidos con el gen <i>POMT1</i> mutagenizado en células	88
6. PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS	88
RESULTADOS	89
1. BÚSQUEDA DE LOS GENES RESPONSABLES DEL WWS	91
1.1. Gen de la <i>proteína O-manosiltransferasa 1: POMT1</i> . El gen <i>POMT1</i> como causante del síndrome de Walker-Warburg	91
1.2. Genes <i>DNAJB6</i> , <i>DNAJB11</i> y <i>CRYAB</i> . Los genes <i>DNAJB6</i> , <i>DNAJB11</i> y <i>CRYAB</i> podrían ser responsables de ciertos casos de WWS aún por diagnosticar molecularmente	93
1.3. Gen de la <i>fukutina: FKTN</i> . El gen de la <i>fukutina</i> ha resultado ser un gen con prevalencia en el WWS	94
2. ANÁLISIS MUTACIONAL DE LOS GENES RESPONSABLES DEL WWS	94

2.1. Análisis mutacional del gen <i>POMT1</i> . El gen <i>POMT1</i> continua siendo la causa principal del WWS	94
2.1.1. Familia 1	95
2.1.2. Familia 2	97
2.1.2.1. Rastreo mutacional del gen <i>POMT1</i> en la madre 2.2	98
2.1.2.2. Estudio de SNPs	98
2.1.2.3. Estudio de otros polimorfismos intragénicos del gen <i>POMT1</i>	100
2.1.2.3. Ensayo de Southern blot	102
2.1.2.4. Análisis mediante MLPA (Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación)	103
2.1.3. Pacientes 5.1 y 6.1	104
2.1.3.1. Estudio del mensajero de <i>POMT1</i> en los pacientes 5.1 y 6.1	106
2.2. Análisis mutacional del gen de la <i>fukutina</i> . El gen de la <i>fukutina</i> se muestra como la tercera causa más probable de los casos de WWS	109
2.2.1. Paciente 3.1	109
2.2.2. Familia 4	110
2.3. Alfa-Distroglucanopatías aun por caracterizar	112
2.3.1. Familia 7	112
3. ANATOMÍA PATOLÓGICA	113
3.1. Estudios de Western blot. α -DG, β -DG y laminin overlay. Análisis del estado de glicosilación del α -dístroglicano .	113
3.1.1. El α -DG glicosilado no se detecta en extracto de proteína total de pacientes de WWS	113
3.1.2. El β -DG se detecta correctamente en extracto de proteína de pacientes de WWS	114
3.2. Estudios de Inmunofluorescencia	115
3.2.1. Estudio de proteínas implicadas en el complejo DGC. El α -DG glicosilado no se detecta en criosecciones musculares de pacientes de WWS	115
3.2.2. Estudio de la proteína <i>POMT1</i> . <i>POMT1</i> pierde su localización en el retículo sarcoplásmico de la célula muscular y en la zona subsarcolémica en aquellos pacientes con mutación en el gen	120
4. ESTUDIOS FUNCIONALES EN CÉLULAS EN CULTIVO DE UN PACIENTE DE WWS (Familia 4)	122
4.1. La <i>fukutina</i> como gen responsable de un caso de WWS.	122
4.2. El mensajero de la <i>fukutina</i> no sufre "mRNA decay" a pesar de tener la mutación antes de la unión de los dos últimos exones.	122
4.3. El dístroglucano se detecta en extractos totales de proteína de linfoblastos	124
4.4. El α -DG se libera al medio de cultivo de los linfoblastos	124
4.5. Sobreexpresión del dístroglucano en linfoblastos inmortalizados	125
4.5.1. El péptido señal propio del dístroglucano es importante en linfoblastos para su correcta migración a la membrana. El β -DG se localiza correctamente en la membrana de los linfoblastos inmortalizados	126
4.5.2. El α -DG pierde su localización de membrana en las células con mutación en el gen de la <i>fukutina</i> en estado de homocigosis	128
5. MUTAGENESIS DIRIGIDA EN EL GEN <i>POMT1</i>	130
DISCUSIÓN	133
1. MUTACIONES ENCONTRADAS EN EL GEN <i>POMT1</i>	136
1.1. Familia 1	136
1.2. Familia 2	137
1.3. Pacientes 5.1 y 6.1	138

2. MUTACIONES ENCONTRADAS EN EL GEN DE LA <i>FUKUTINA</i>.....	140
2.1. Paciente 3.1.....	140
2.2. Familia 4.....	142
3. EFECTO DE LAS MUTACIONES DETECTADAS EN LAS FAMILIAS SOBRE EL DISTROGLICANO	145
3.1. Hipoglicosilación del α -DG en la familia 4	145
3.1.1. Pérdida de localización en membrana del α -DG en linfoblastos inmortalizados de los miembros de la familia 4	146
3.2. Hipoglicosilación del α -DG en los pacientes 5.1 y 6.1	147
3.3. Hipoglicosilación del α -DG en el paciente 7.1.....	147
3.4. El β -DG no está afectado en los pacientes de WWS.....	148
4. POSIBLES EFECTOS FUNDADORES	148
4.1. Efecto fundador de mutaciones en el gen <i>POMT1</i> en la población de etnia gitana española.....	149
4.2. Efecto fundador de una mutación en el gen de la <i>fukutina</i> en la población judía.....	149
5. RELEVANCIA DEL GEN DE LA <i>FUKUTINA</i> EN EL WWS	150
6. EFECTOS FENOTÍPICOS ANÓMALOS EN PACIENTES CON MUTACIONES EN LOS GENES DE LA <i>FUKUTINA</i> O <i>FKRP</i>	151
7. HETEROGENEIDAD GENÉTICA Y HETEROGENEIDAD FENOTÍPICA.....	152
CONCLUSIONES	155
BIBLIOGRAFÍA.....	159
ANEXO	167

Abreviaturas



aa: Aminoácido

α -DG: Alfa-distroglicano

β -DG: Beta-distroglicano

BSA: Albúmina de suero bovino (en inglés Bovine Serum Albumin)

cDNA: DNA complementario al mRNA

CHO: Células de ovario de hámster chino (en inglés Chinese Hamster Ovary)

CMD: Distrofia Muscular Congénita (en inglés Congenital Muscular Dystrophy)

CPK: Creatina fosfoquinasa (en inglés Creatin Phosphokinase)

CSPD: Disodio 3-(4-metoxispiro{1,2-dioxetano-3,2'(5'cloro)tríciclo[3.3.1.1.^{3,7}]decano}-4-il) fenil fosfato

DAPI: Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (en inglés 4'-6-Diamidino-2-phenylindole)

DCX: Gen de la doblecortina

DEPC: Dietil pirocarbonato

DGC: Complejo Glicoproteico de unión a Distrofina (en inglés Dystrophyn Glycoprotein Complex)

DMEM: Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (en inglés Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

DNAg: DNA genómico

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

DTT: 1,4-Ditiotreitol

ECM: Matriz extracelular (en inglés Extracellular Matrix)

DXD: motivo consistente en tres aminoácidos: Aspártico, aminoácido indeterminado, aspártico

E. coli: *Escherichia coli*

ECM: Matriz extracelular (en inglés Extracellular Matrix)

EDTA: Sal disódica de ácido etilen-diamino tetra acético

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción enzimática (en inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

EST: Fragmento de secuencia nucleotídica transcrita (en inglés Expressed Sequence Tag)

FBS: Suero fetal bovino (en inglés Foetal Bovine Serum)

FCMD: Distrofia muscular congénita tipo Fukuyama (en inglés Fukuyama type Congenital Muscular Dystrophy)

FKRP: Proteína relacionada con fukutina (en inglés Fukutin Related Protein)



FLNA: Gen de la filamina 1

Fuc: Fucosa

Gal: Galactosa

Glc: Glucosa

GlcN: Glucosamina

GlcNAc: *N*-acetilglucosamina

GalNAc: *N*-acetilgalactosamina

HCl: Ácido clorhídrico

HE: Hematoxilina-eosina

HEK: (células) embrionarias humanas de riñón (en inglés, Human Embryonic Kidney)

HNAC: Ceramidasa mitocondrial neutra-alcalina (en inglés Human Neutral-alkaline Ceramidase).

HS: Suero de caballo (en inglés Horse Serum)

HSP: Proteína de choque térmico (en inglés Heat Shock Protein)

IF: Inmunofluorescencia

Kb: Kilobase

KDa: Kilodalton

LGMD: Distrofia muscular de anillo óseo, también llamada distrofia muscular de cinturas (en inglés Limb-girdle Muscular Dystrophy)

LicD: Dominio implicado en el metabolismo de la fosforilcolina

LIS1: Gen de la lisencefalia 1

mA: Miliamperios

Man: Manosa

μCi: Microcurios

MDC1C: Distrofia muscular congénita tipo 1C (en inglés Congenital Muscular Dystrophy type 1C)

MDC1D: Distrofia muscular congénita tipo 1D (en inglés Congenital Muscular Dystrophy type 1D)

μg: Microgramo/s

mm: Milímetro/s

MEB: Enfermedad músculo-ojo-cerebro (en inglés Muscle-eye-brain)

min: Minuto/s



MIR: Dominios comunes a Manosiltransferasas y a los receptores de Inositol 1,4,5 trifosfato (InsP3R) y de Rianodina (RyR)

MLPA: Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación (en inglés Multiplex Ligation Dependent Amplification)

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

NaCl: Cloruro sódico

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica (en inglés, National Center for Biotechnology Information)

ng: Nanogramo/s

NGS: Suero normal de cabra (en inglés Normal Goat Serum)

NO sintasa: Sintasa de óxido nítrico

OMIM: Herencia Mendeliana en el Hombre en Red (en inglés, Online Mendelian Inheritance in Man)

O/N: Durante toda la noche (en inglés Overnight)

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida (en inglés Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

pb: Pares de bases

PBS: Solución tamponada con fosfatos (en inglés Phosphate-buffered Saline)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (en inglés Polymerase Chain Reaction)

pmol: picomol/es

PMSF: Fenil metil sulfonilo fluoruro (en inglés Phenylmethylsulfonylfluoride)

PMT: Proteína manosil transferasa

POMGnT1: Proteína *O*-manosa β -1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa 1 (en inglés Proteín *O*-mannose β -1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1)

POMT1: Proteína *O*-manosil transferasa 1

POMT2: Proteína *O*-manosil transferasa 2

PSF: Purificación libre de sales (en inglés Purification Salt Free)

PVDF: Difluoruro de polivinilo (en inglés Polivinil Difloruro)

RE: Retículo Endoplásmico

RMN: Resonancia magnética nuclear

rpm: Revoluciones por minuto

RPMI: Medio de cultivo del Instituto “Roswell Park Memorial” (en inglés Roswell Park Memorial Institute)



RS: Retículo sarcoplásmico

SDS: Sulfato de dodecilo sódico

seg: Segundo/s

Ser: Serina/s

Sia: Ácido siálico

SINE: Elemento nucleotídico intercalado pequeño (en inglés Short Interspersed Nucleotide Element)

siRNA: RNA de interferencia pequeño (en inglés, Small Interfering RNA)

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido (en inglés Single Nucleotide Polymorphism)

SNC: Sistema nervioso central

SSC: Solución salina de citrato

SVA: retrotransposón compuesto de tres tipos de polimorfismos: SINE, VNTR y *Alu*.

T^a: Temperatura

TAC: Tomografía axial computarizada

TBE: Tampón Tris-borato-EDTA

TBS: Solución tamponada con Tris-HCl (en inglés Tris-buffered Saline)

TBS-T: TBS con 0,1 % Tween 20

Thr: Treonina/s

TORCH: Toxoplasmosis, rubeola, citomegalovirus y herpes simple.

U: Unidades enzimáticas

UI: Unidades internacionales

UTR: Secuencia no traducida (en inglés Untranslated Region)

VNTR: Polimorfismo consistente en número variable de repeticiones en tándem (en inglés Variable Number of Tandem Repeats)

WB: Western blot

WWS: Síndrome de Walker-Warburg (en inglés Walker-Warburg Syndrome)

wt: Fenotipo o genotipo más común que se encuentra en la naturaleza, no modificado genéticamente (en inglés Wild-type).

Introducción



Este trabajo de investigación se centra en la determinación de las bases moleculares subyacentes al síndrome de Walker-Warburg.

El síndrome de Walker-Warburg debe su nombre a Arthur Earl Walker, neurólogo estadounidense y a Mette Warburg, oftalmóloga danesa. A.E. Walker describió el primer caso de lisencefalia (del griego, cerebro liso) en 1942 y posteriormente M. Warburg describió defectos oculares en pacientes con retraso mental en 1971. Las características diagnósticas que definen el síndrome de Walker-Warburg son: hidrocefalia (H), agiria (A), displasia (D) retiniana (R) y en ocasiones, encefalocele (E), por lo cual este síndrome es también llamado síndrome HARD+/-E. También tiene otras acepciones tales como: síndrome de Chemke, síndrome de Pagon o Disgenesia cerebro-ocular.

1. EL SÍNDROME DE WALKER-WARBURG

1.1. Descripción y patologías relacionadas

El síndrome de Walker-Warburg (WWS, OMIM 236670) está catalogado como enfermedad rara (aquella cuya incidencia en la población es menor a 5 de cada 10.000 nacimientos), y dentro de esta categoría tiene una incidencia especialmente baja, de aproximadamente 1 individuo afectado por cada millón de nacimientos. Es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada clínicamente por presentar anomalías cerebrales, musculares y oculares. Los defectos cerebrales incluyen alteraciones en la migración neuronal, lo que da lugar a lisencefalia tipo II, hidrocefalia, fusión de los hemisferios cerebrales, agenesia del cuerpo calloso, hipoplasia cerebelar y ocasionalmente encefalocele. En cuanto a las alteraciones musculares, los pacientes presentan distrofia muscular congénita (degeneración progresiva y debilidad de los músculos voluntarios), presentando niveles de creatina quinasa (CPK) sérica superiores a 1.000 UI/L (siendo los valores normales de 40-500 UI/L). Las anomalías oculares incluyen cataratas, microftalmia unilateral o bilateral, buftalmos, hipoplasia o ausencia del nervio óptico y anomalía de Peter (Muntoni and Voit, 2004; van Reeuwijk *et al.*, 2005a).

El WWS, la distrofia muscular congénita tipo Fukuyama (FCMD, OMIM 253800) y la enfermedad músculo-ojo-cerebro (MEB, OMIM 253280) son enfermedades autosómicas



recesivas clínicamente muy similares. Las tres cursan con distrofia muscular congénita, alteraciones cerebrales y anomalías oculares, diferenciándose en el grado de afectación que presentan los pacientes. La gravedad de estos síntomas va aumentando en los tres tipos de patología siendo la FCMD la más leve de estas enfermedades y el WWS la más grave de las tres, especialmente en cuanto a la afectación cerebral. Los pacientes con síndrome de Walker-Warburg presentan un alto grado de afectación desde su nacimiento y su esperanza de vida no suele alcanzar el año de vida.

En un principio, y dada la alta co-ocurrencia familiar, se pensó que el WWS y la FCMD eran enfermedades alélicas; sin embargo, análisis genéticos posteriores descartaron esta hipótesis, al comprobarse que las familias en las que aparecían individuos con WWS no mostraban ligamiento genético con el locus FCMD en 9q31, o con el de la enfermedad MEB en 1p43-p33. Curiosamente, ahora que se conocen más ampliamente las bases moleculares de estas tres enfermedades, se ha evidenciado que los genes causantes de éstas y otras alfa-distroglicanopatías son causadas por el mismo grupo de genes funcionalmente relacionados (van Reeuwijk *et al.*, 2005a).

1.2. Bases moleculares del WWS. Heterogeneidad genética

En el año 2002 se asoció por primera vez un gen al WWS. Nuestro grupo, en colaboración con el grupo del Dr. Brunner, realizó la caracterización del primer gen causante del WWS, estudio que se detalla posteriormente en “Resultados”, sección 1.1. Fue el gen de la *proteína O-manosiltransferasa 1 (POMT1)* (Beltran-Valero de Bernabe *et al.*, 2002).

Es característico de las enfermedades raras de carácter autosómico recesivo que la mayor parte de los enfermos provengan de poblaciones con un alto grado de consanguinidad, por transmisión de una mutación en un gen que es responsable del efecto fundador. Sin embargo, en el trabajo citado se constató desde un principio que no todos los pacientes diagnosticados de WWS presentaban mutación en este gen, ya que sólo un bajo porcentaje de ellos (aproximadamente un 20 %) presentó mutaciones en *POMT1*, mientras que en el resto de pacientes no se identificó mutación causante de la enfermedad. Estos primeros resultados de la caracterización molecular del WWS hicieron pensar que se trataba de un síndrome genéticamente heterogéneo, y que mutaciones en otros genes que participasen en la



O-manosilación de proteínas podrían dar lugar a esta misma enfermedad. Trabajos posteriores han confirmado que el síndrome de Walker-Warburg también está causado por mutaciones en los genes de la *fukutina* (*FKTN*) (de Bernabe *et al.*, 2003; Silan *et al.*, 2003; Godfrey *et al.*, 2007), la *fukutin related protein* (*FKRP*) (Beltran-Valero de Bernabe *et al.*, 2004), la *proteína O-manosiltransferasa 2* (*POMT2*, homólogo de *POMT1*) (van Reeuwijk *et al.*, 2005b) y más recientemente en el gen *LARGE* (Godfrey *et al.*, 2007; van Reeuwijk *et al.*, 2007). Aun así, teniendo en cuenta el total de los pacientes en los cuales se ha encontrado mutación en alguno de estos cinco genes, sólo representan un porcentaje aproximado del 25% de los enfermos de WWS descritos. Este porcentaje nos da una idea de la amplia heterogeneidad genética del citado síndrome y es el motor que impulsa la búsqueda de nuevos genes candidatos a causar el cuadro sintomático que corresponde al WWS.

2. EL GEN *POMT1* Y LA *O*-MANOSILACIÓN

2.1. *N*-glicanos y *O*-glicanos

Dentro de la glicosilación proteica existen dos grandes grupos: la *N*-glicosilación y la *O*-glicosilación. Estos grupos se establecen de acuerdo con el tipo de enlace que se establece entre el azúcar y el aminoácido de la proteína. En la *N*-glicosilación los carbohidratos se unen principalmente a residuos de asparagina (Asn), denominándose entonces *N*-glicanos; mientras que en la *O*-glicosilación los carbohidratos se unen a residuos de serina o treonina (Ser o Thr), llamándose entonces *O*-glicanos. Dentro de los *N*-glicanos, el principal residuo glicosídico por el cual comienza la cadena de carbohidratos es la *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), que establece un enlace con el grupo amida de la Asn. En los *O*-glicanos, la modificación más importante es el enlace que establece un monosacárido con el grupo hidroxilo de residuos de Ser o Thr (Endo, 2004), pudiendo ser este monosacárido *N*-acetilglucosamina, fucosa (Fuc), glucosa (Glc), *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) o manosa (Man). En este último caso se denomina al proceso *O*-manosilación.

El gen *POMT1*, localizado en 9q34.1, codifica una proteína integral de membrana de retículo endoplásmico que cataliza la incorporación de residuos de manosa sobre serinas y/o treoninas de glicoproteínas. *POMT1* presenta homología con la familia de proteínas manosiltransferasas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (ScPMTs). En la Figura 1 se



representa la estructura predicha para la proteína POMT1, modificada de la predicha por Girrbaach *et al.* (2000) para la PMT1 de levaduras.

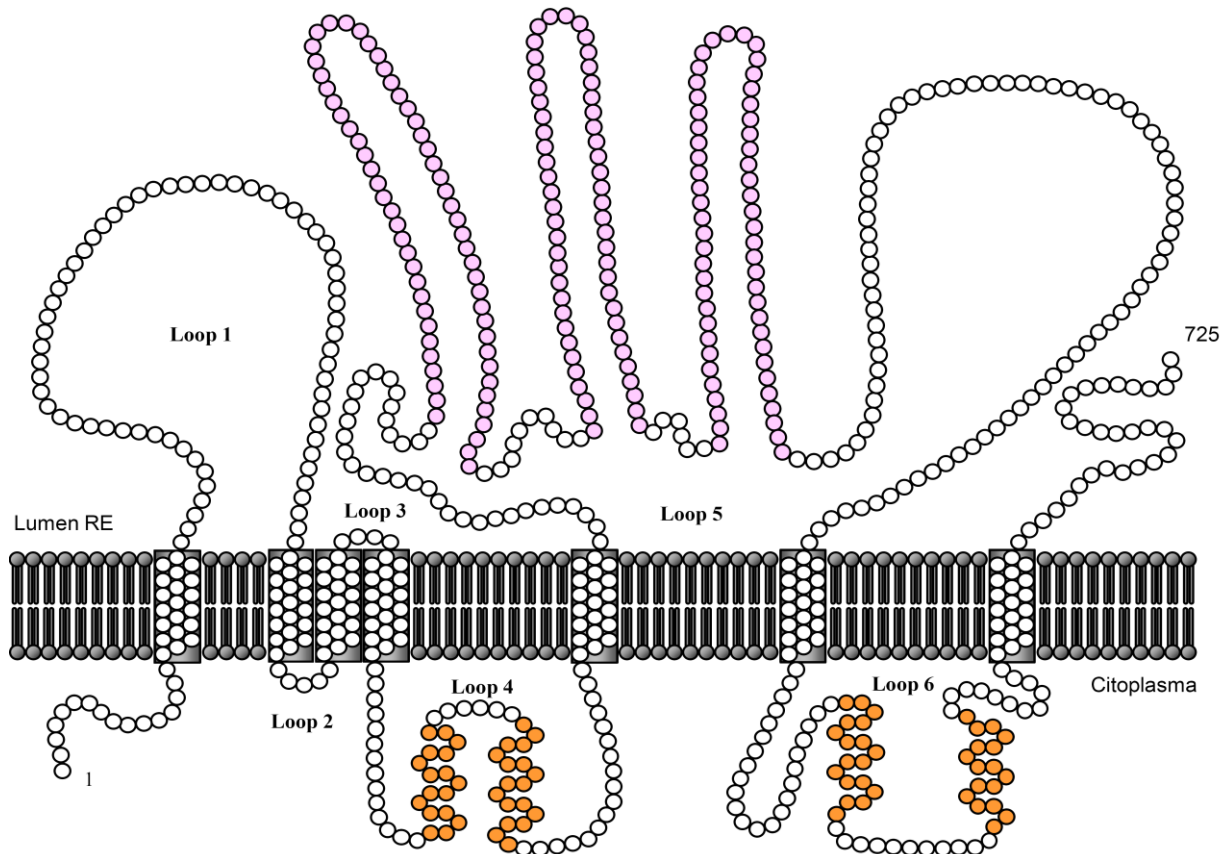


Figura 1. Estructura predicha para la proteína POMT1 en la membrana del retículo endoplásmico (RE). Se observan 7 dominios transmembrana que darían lugar a 6 “loops”. También se muestran cuatro dominios alfa-hélice en naranja y tres dominios MIR en rosa. El extremo N-terminal se encuentra en el lado citoplásmico y el C-terminal en el lumen del retículo endoplásmico. Dominios MIR: dominios comunes a Manosiltransferasa y a los receptores de Inositol 1,4,5 trifosfato (InsP3R) y de Rianodina (RyR).

2.2. O-manosilglicanos

Los O-manosilglicanos fueron identificados por primera vez en la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae* y durante muchos años la O-manosilación fue considerada como una modificación post-traduccional propia de levaduras, hasta que a finales de los 80 se evidenció la presencia de O-manosilglicanos en mamíferos al ser aislados



de cerebro de rata (Finne *et al.*, 1979). La estructura propuesta fue Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Man-Ser/Thr, pudiendo contener asimismo fucosa, ácido siálico y/o sulfato. Durante años fueron considerados glicanos exclusivos de proteoglicanos cerebrales, hasta que en 1997 se identificaron estas estructuras en el α -dístroglicano (α -DG) de nervio periférico bovino (Chiba *et al.*, 1997), y posteriormente también en el α -DG de músculo de conejo (Sasaki *et al.*, 1998).

Recientemente, los *O*-manosilglicanos han cobrado un gran interés general al haberse comprobado que defectos en la síntesis de estas cadenas de carbohidratos dan lugar a diversas formas de distrofias musculares congénitas (CMDs) que a menudo se encuentran asociadas a anomalías cerebrales. La gran mayoría de estos *O*-manosilglicanos representan variaciones del tetrasacárido NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man-Ser/Thr que se diferencian en cuanto a longitud de la cadena y en cuanto al contenido en fucosa (Figura 2).

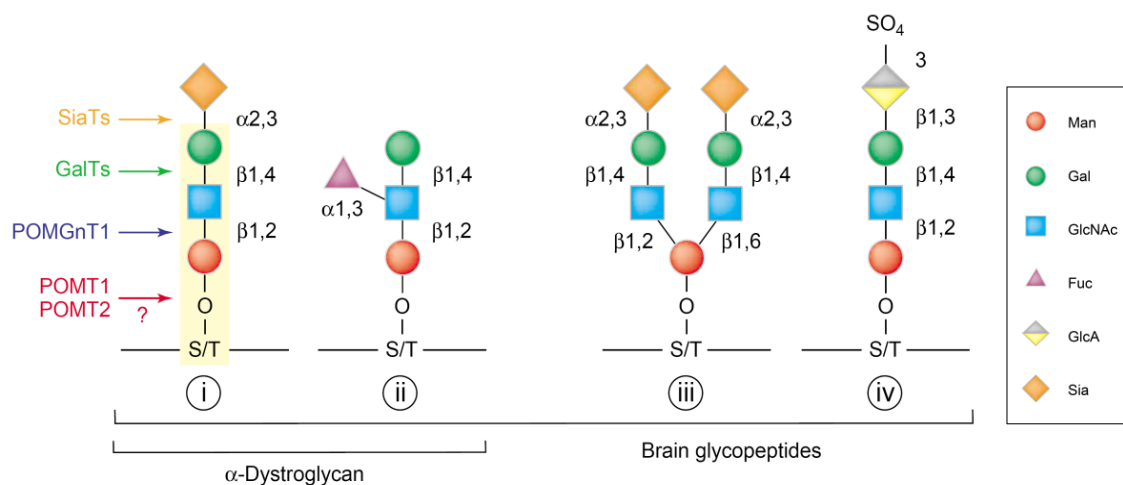


Figura 2. (Willer *et al.*, 2003). Representación de las secuencias de *O*-manosilglicanos en mamíferos. Se observan variaciones en la secuencia de los *O*-manosilglicanos en cuanto a la longitud de la cadena y a la presencia de ácido siálico, fucosa o sulfato. La estructura sombreada en amarillo Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man-Ser/Thr es la estructura básica común a todos los *O*-manosilglicanos aislados de mamíferos hasta a la fecha. Los cuatro tipos de estructuras mostrados pueden encontrarse en proteoglicanos cerebrales, mientras que en el α -DG se encuentran las dos primeras estructuras mostradas (i y ii).



2.3. Las proteínas *O*-manosiltransferasas y el α -dístroglicano

La biosíntesis de *O*-manosilglicanos ha sido ampliamente estudiada en levaduras. Se inicia en el retículo endoplásmico (RE) por una familia de proteínas *O*-manosiltransferasas (PMTs) evolutivamente muy conservadas, que catalizan la transferencia de un residuo de manosa desde dolicol-fosfato manosa (Dol-P- β -D-Man) a residuos de serinas o treoninas de proteínas de la ruta de secreción. En levaduras, la *O*-manosilación es esencial para la viabilidad celular ya que es indispensable para el mantenimiento de la rigidez de la pared celular (Willer *et al.*, 2003; Endo, 2004). En mamíferos han sido identificadas dos proteínas *O*-manosiltransferasas por homología de secuencia con las PMTs de levaduras: POMT1 y POMT2. La única diana de *O*-manosilación identificada en mamíferos es el α -dístroglicano, el cual contiene abundantes *O*-manosilglicanos. Los principales *O*-manosilglicanos del α -DG son variaciones del tetrasacárido NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man-Ser/Thr (Willer *et al.*, 2003; Endo, 2004).

A finales del año 2003 se consiguió realizar la medida de actividad enzimática de POMT1 *in vitro*. Este trabajo demostró por primera vez la actividad *O*-manosiltransferasa (Manya *et al.*, 2004). En este mismo trabajo y en otro publicado poco después se demuestra que POMT1 requiere de la coexpresión de POMT2 para poder desarrollar actividad enzimática (Akasaka-Manya *et al.*, 2004; Manya *et al.*, 2004), lo cual hace suponer que POMT1 y POMT2 podrían actuar como un heterodímero. Así, las proteínas POMT1 y POMT2 actuarían de manera conjunta introduciendo el primer residuo de manosa del tetrasacárido NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2**Man**-Ser/Thr sobre Ser/Thr del α -DG (Manya *et al.*, 2004). Ambas son proteínas integrales de membrana localizadas en el RE y fundamentales para la correcta glicosilación del α -DG. Recientemente esta medida de actividad enzimática *O*-manosiltransferasa se ha realizado en linfoblastos inmortalizados de pacientes con CMD que presentan deficiencias en la glicosilación del α -DG. En este trabajo se demuestra una reducción considerable en la actividad enzimática de POMT1 en pacientes que tienen mutaciones en este gen (Manya *et al.*, 2007). Hasta el momento, solamente se han identificado las proteínas que dan lugar a los dos primeros pasos de la síntesis de este tetrasacárido, de las cuales también se ha demostrado su actividad enzimática. Así, el complejo POMT1-POMT2 cataliza el primer paso, introduciendo moléculas individuales del



monosacárido manosa a serinas o treoninas presentes en la zona tipo mucina (región rica en Ser y Thr) del α -DG. La proteína *O*-manosa β -1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa 1 (POMGnT1) añade el siguiente residuo de *N*-acetilglucosamina a la manosa, siendo aún desconocidas las proteínas responsables de los pasos subsiguientes.

2.4. Ortólogos del gen *POMT1*

Aparte de la ya citada homología con las PMTs de levaduras, los genes ortólogos más estudiados de *POMT1* y *POMT2* son los genes *rotated* (*rt*) y *twisted* (*tw*), respectivamente, de *Drosophila*. Las moscas con fenotipo *rt* o *tw* se caracterizan por presentar defectos durante el desarrollo larvario y una rotación helicoidal del abdomen en el estadio adulto (Martin-Blanco and Garcia-Bellido, 1996). Nuestro grupo ha llevado a cabo la caracterización del gen *Pomt1* murino, y ha demostrado que la interrupción génica del gen *Pomt1* en el ratón genera letalidad embrionaria por anomalías en la formación de la membrana de Reichert, como resultado de la incorrecta glicosilación del α -DG (Willer *et al.*, 2004). En este mismo trabajo se demuestra que durante la embriogénesis del ratón, el mRNA de *Pomt1* se expresa en ciertos tejidos de forma predominante. El patrón de expresión observado sugirió que *Pomt1* está implicado en el desarrollo del músculo, del sistema nervioso y del ojo, tejidos principalmente afectados en el WWS.

Estos resultados han sido más ampliamente corroborados en un trabajo posterior en el cual se demuestra que este patrón de expresión se mantiene en estadios embrionarios posteriores e incluso en el ratón adulto (Prados *et al.*, 2007). Además, en este mismo trabajo se muestra la expresión de *Pomt1* en el acrosoma de las espermátidas en maduración. Este mismo patrón de expresión ha sido observado para el mRNA del gen *Pomt2* de ratón (Willer *et al.*, 2002). Este hecho es relevante, ya que el α -DG no se glicosila en estas células, por lo que las proteínas Pomt han de tener un sustrato distinto de *O*-manosilación en ellas. Por ello se postula que puedan llevar a cabo una función distinta en este tipo celular, y que podrían estar implicadas en procesos de espermatogénesis (Prados *et al.*, 2007).

Estos datos demuestran la relevancia del correcto funcionamiento de estas proteínas tanto en la edad adulta como durante el desarrollo embrionario.



2.5. Heterogeneidad fenotípica

Además del WWS, se han observado otros fenotipos patológicos en ciertos pacientes que han resultado estar causados por mutaciones en el gen *POMT1*. El primer trabajo que dejó constancia de esta variabilidad fenotípica mostró cinco pacientes con diagnóstico de una variante nueva de distrofia muscular de anillo óseo (también llamada distrofia muscular de cinturas, LGMD) que presentaban un leve retraso mental (Balci *et al.*, 2005). Esta nueva variante, llamada LGMD tipo 2K (LGMD2K), fue posteriormente identificada en otros 3 pacientes que también presentaron mutaciones en el gen *POMT1*; si bien los síntomas de estos últimos pacientes fueron más graves que los identificados en los primeros casos, sobre todo en lo que se refiere al desarrollo motor y al retraso mental. En estos últimos casos, pese a la mayor afectación cerebral manifestada, no se observaron anomalías estructurales en el cerebro de los pacientes, ni afectación ocular (D'Amico *et al.*, 2006). Poco después, un trabajo mostró en conjunto una serie de pacientes cuyas mutaciones en *POMT1* daban lugar a fenotipos que variaban desde WWS hasta CMD con microcefalia y retraso mental severo (van Reeuwijk *et al.*, 2006). Estos últimos pacientes bien podrían englobarse dentro de la nueva variante LGMD2K (aunque con una mayor gravedad).

Posteriormente han ido descubriéndose cada vez más mutaciones en *POMT1*. Recientemente se ha realizado un amplio estudio mutacional para este gen en fetos con lisencefalia tipo II, ya que esta característica parece ser recurrente en alfa-distroglicanopatías graves como el WWS y la enfermedad MEB (Bouchet *et al.*, 2007a). Actualmente, las características clínicas de los pacientes en los que buscar mutaciones en el gen *POMT1* son muy amplias, abarcando desde el WWS, pasando por CMDs con retraso mental, hasta LGMDs con retraso mental (Godfrey *et al.*, 2007). Se han encontrado mutaciones en *POMT1* en pacientes cuya afectación muscular y cerebral es variable en su gravedad, pero parece evidenciarse que todos los pacientes que presentan mutaciones en *POMT1* o *POMT2* tienen algún tipo de afectación cerebral, aunque sea manifestada en forma de retraso mental (Godfrey *et al.*, 2007), lo cual no ocurre en las distintas variantes fenotípicas a las que dan lugar mutaciones en los genes de la *fukutina* o de la *FKRP* (Godfrey *et al.*, 2006a; Murakami *et al.*, 2006b). Un reciente trabajo muestra como única excepción una paciente diagnosticada



de LGMD2 con mutación en el gen *POMT2* que no presenta retraso mental (Biancheri *et al.*, 2007).

A la luz de estos trabajos se puede determinar que mutaciones en el gen *POMT1* no se correlacionan con un fenotipo determinado, sino que dependerá de la repercusión que tenga la mutación ocurrida con respecto a la estructura, función o mecanismos de interacción de la proteína. En la Figura 3 se muestra la proteína POMT1, en la que se detallan todas las mutaciones encontradas hasta la fecha. La gravedad del fenotipo al que da lugar cada mutación viene codificada por un código de color. Nótese que la mayor parte de las mutaciones que dan lugar a fenotipos más suaves se encuentran en la zona citoplásmica de la proteína. Sin embargo, hay que tener en cuenta que muchas de estas mutaciones se han encontrado en heterocigosis, por lo que sólo se puede especular sobre si la gravedad del fenotipo es resultado de una de las dos mutaciones (por afectar más a la proteína) o sería resultado del efecto conjunto de las dos. También hay que tener en cuenta que la misma mutación puede afectar de forma diferente a individuos distintos. Así, la mutación p.Arg200Pro, descrita por primera vez en un individuo con LGMD2K presentando leve retraso mental, aparece en estado de homocigosis en otros dos individuos, uno de ellos diagnosticado con LGMD2K y el otro con CMD con retraso mental, un grado más de severidad en el fenotipo (Godfrey *et al.*, 2007).

En la tabla 1 se muestran los distintos fenotipos que han sido observados en enfermos de alfa-distroglicanopatías y que han resultado albergar mutaciones en *POMT1*.

Tabla 1. Interpretación de los fenotipos producidos por mutaciones en *POMT1*

ENFERMEDAD	AFECTACIÓN CEREBRAL	AFECTACIÓN MUSCULAR	AFECTACIÓN OCULAR
WWS	Grave, lisencefalia tipo II	Grave, CMD	Grave
CMD-MR	Media, microcefalia y retraso mental severo	Media, CMD menos acusada	Leve o ninguna
LGMD2K	Suave, sin alteraciones estructurales visibles y retraso mental suave	Leve, distrofia muscular progresiva establecida a los meses de nacer*	Ninguna

* Establecida como mínimo a los meses del nacimiento, ya que por definición se excluye la distrofia muscular congénita. La afectación muscular puede llegar a desarrollarse incluso más tardíamente.

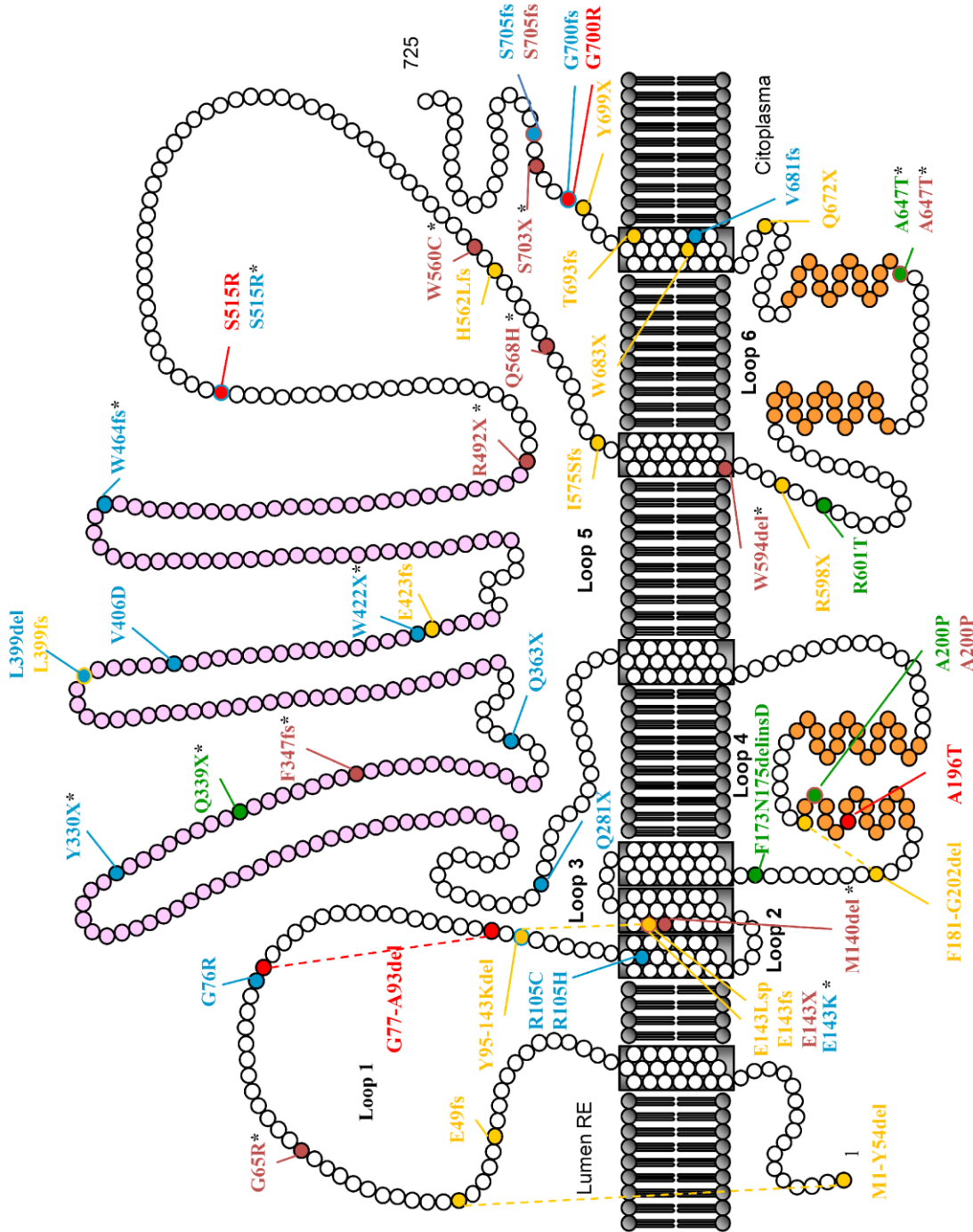
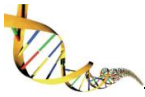


Figura 3. Se muestran todas las mutaciones encontradas en el gen *POMT1* a nivel de proteína predicha: en azul se muestran las mutaciones que dan lugar a WWS, en rojo las descritas más adelante en este trabajo, en verde las mutaciones que dan lugar a LGM con retraso mental (LGMD2K), en marrón las que dan lugar a CMD con retraso mental (variante severa de LGMD2K) y en amarillo las mutaciones descritas en fetos con lisencefalia. Las líneas discontinuas representan pérdida de varios aa (los que se encuentran entre los marcados de fallos de “splicing”). En los casos en los que la misma mutación da lugar a fenotipos distintos se ha marcado con el color del que más número de casos documentados hay; si coincide el número de casos se marca con el color del fenotipo más grave. Los asteriscos indican mutaciones encontradas en heterocigosis con otras.



3. DISTROGLICANO Y COMPLEJO GLICOPROTEICO DE UNIÓN A DISTROFINA. ALFA-DISTROGLICANOPATÍAS

3.1. El distroglicano

Hasta la fecha sólo se ha identificado una glicoproteína diana de *O*-manosilación por parte del complejo POMT1-POMT2, el α -distroglicano. El distroglicano fue inicialmente identificado como un componente integral de membrana formando parte del complejo glicoproteico de unión a distrofina (DGC), un complejo multimérico transmembranal aislado por primera vez de músculo esquelético (Barresi and Campbell, 2006) que se compone de una variedad de proteínas intracelulares, transmembranales y extracelulares. En vertebrados, el distroglicano viene codificado por un único gen (*DAG1*), que en humanos mapea en 3p21. Este gen da lugar a un péptido precursor de 895 residuos aminoacídicos que por rotura proteolítica da lugar a las subunidades alfa y beta.

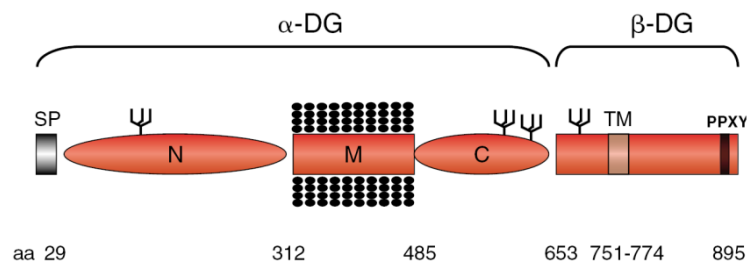


Figura 4. (Barresi and Campbell, 2006). Organización de los dominios del distroglicano. En el α -DG maduro, el dominio *N*-terminal se escinde por medio de actividad tipo convertasa, entre la Arg312 y la Gln313. Los círculos negros indican *O*-glicosilación y las ramificaciones *N*-glicosilación. SP: péptido señal; TM: dominio transmembrana; PPXY: sitio de unión a distrofina.

3.2. El complejo glicoproteico de unión a distrofina (DGC)

El DG desarrolla una función fundamental en la interacción del citoesqueleto intracelular con las proteínas de la matriz extracelular (ECM) en diversos tejidos. El α -distroglicano es una glicoproteína extracelular que se ancla a la membrana plasmática mediante una unión de tipo no covalente al β -distroglicano, que atraviesa la membrana. Las cadenas de *O*-glicanos del α -DG son un componente fundamental del DGC, ya que mediante estos residuos glicosídicos el α -DG establece interacciones con componentes de la matriz,



proteínas que poseen dominios LamG tales como la laminina, la agrina y el perlecan en músculo, y la neurexina en cerebro (Figura 5).

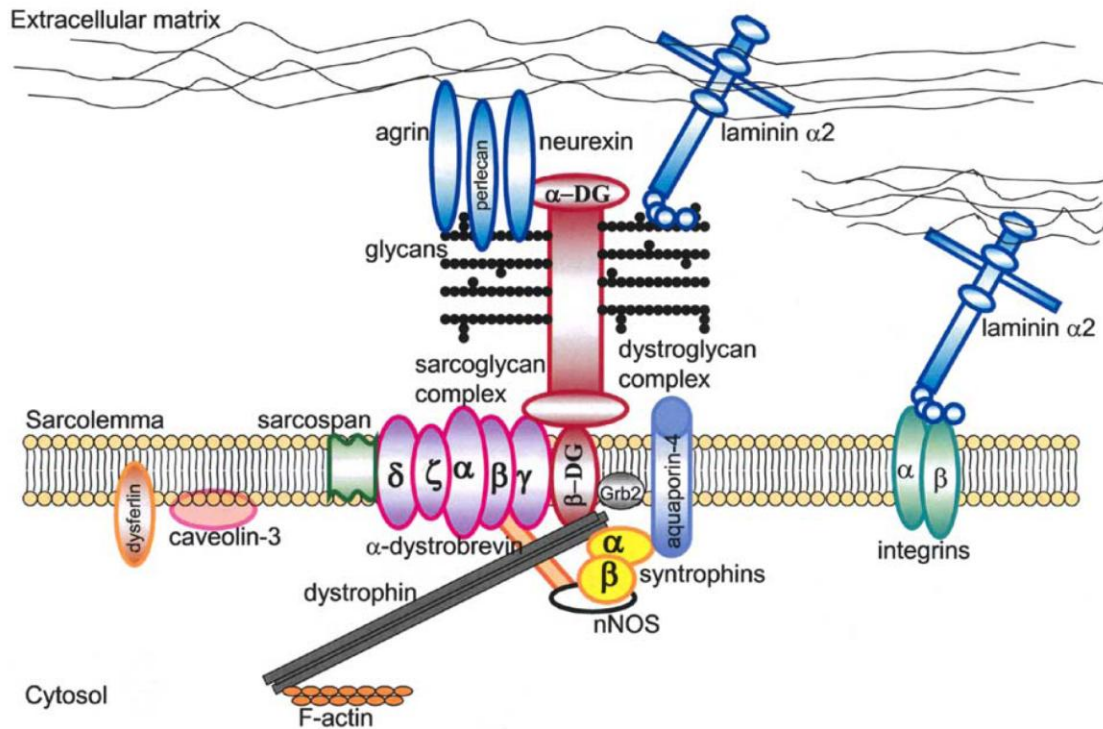


Figura 5. (Cohn, 2005). Estructura esquemática del DGC en la membrana de la célula muscular esquelética. Se muestran los componentes integrales y periféricos, así como otras proteínas asociadas.

Por su parte, el β -DG realiza las funciones de nexo de esta matriz con el citoesqueleto intracelular de actina mediante la interacción con la distrofina. A través de la distrofina, el DGC establece asimismo interacción con la α -distrobrevina y las α y β sintrofinas del citosol. Aunque el papel del complejo DGC está aún por determinar con exactitud, una de las funciones atribuidas a este complejo es la de conferir estabilidad estructural a la membrana sarcoplásmica durante los ciclos de contracción-relajación, impidiendo de este modo que la célula muscular sufra daños inducidos por estrés en la membrana (Cohn, 2005). De hecho, se ha comprobado que mutaciones en alguno de los componentes del DGC hacen que las fibras musculares sean más susceptibles de sufrir daños mecánicos y desembocan en diversas distrofias musculares (Cohn and Campbell, 2000).



Aparte de esta importante función del distroglicano en el mantenimiento de la integridad de la membrana de las células musculares, la interrupción génica dirigida del gen *DAG1* en músculo esquelético diferenciado de ratones, ha revelado que el distroglicano juega un papel en la regeneración del músculo (Cohn *et al.*, 2002). Sin embargo, el distroglicano no es exclusivo del tejido muscular, habiéndose demostrado su expresión en muchos otros tipos de tejidos, donde desarrolla importantes funciones (Barresi and Campbell, 2006).

3.3. Hipoglicosilación del α -DG. Alfa-distroglicanopatías

El distroglicano juega un importante papel en el WWS, ya que un rasgo específico observado en los pacientes de WWS es la hipoglicosilación del α -DG. Defectos en la glicosilación del α -DG tienen lugar también en otras distrofias musculares congénitas que conllevan afectación neuronal tales como la distrofia muscular congénita tipo Fukuyama (FCMD), la enfermedad músculo-ojo-cerebro (MEB), la distrofia muscular congénita tipo 1C (MDC1C), la LGMD tipo 2I (LGMD2I), la LGMD2K y la distrofia muscular congénita tipo 1D (MDC1D). Esto ha hecho que se acuñe el término alfa-distroglicanopatías para designar este tipo de enfermedades que comparten la hipoglicosilación del α -DG.

Tanto en pacientes de WWS como en los de estas otras distrofias mencionadas se observa una marcada reducción o incluso ausencia del α -DG glicosilado. Sin embargo, utilizando anticuerpos específicos que reconocen la zona peptídica del α -DG, se detecta la proteína sin glicosilar, la cual se localiza correctamente en la membrana celular (Longman *et al.*, 2003).

Como ya se ha mencionado, el α -DG es el único sustrato conocido de *O*-glicosilación en mamíferos, aunque anteriormente se había encontrado *O*-glicosilación en proteoglicanos de cerebro (Figura 2). Existen gran cantidad de datos acerca de reducción o incluso falta total de glicosilación en músculo de pacientes de WWS, enfermedad MEB y FCMD (y CMDs relacionadas) (Brockington *et al.*, 2001a; Brockington *et al.*, 2001b; Beltran-Valero de Bernabe *et al.*, 2002; Topaloglu *et al.*, 2003). Además, se ha demostrado que la interrupción génica del α -DG específica de cerebro en ratones da lugar a falta de organización de las capas de la corteza cerebral, fusión de los hemisferios cerebrales, discontinuidades en la



superficie pial y migración anómala de las neuronas post-mitóticas. La patología humana que refleja de forma más fiel el fenotipo mostrado por estos ratones es la lisencefalia tipo II, característica de los enfermos de WWS (Moore *et al.*, 2002).

4. EL GEN DE LA *FUKUTINA*

4.1. Desde FCMD hasta WWS

El gen de la *fukutina*, localizado en 9q31, se describió por primera vez como el gen causante la FCMD, una enfermedad de herencia autosómica recesiva, particularmente frecuente en Japón. La FCMD se caracteriza por anomalías musculares, cerebrales y oculares aunque de menor grado que en el WWS y la enfermedad MEB (Yoshioka and Kuroki, 1994; Cormand *et al.*, 2001), siendo la esperanza de vida de estos pacientes de 10 a 20 años (van Reeuwijk *et al.*, 2005a). La causa más común de esta enfermedad es la inserción de un retrotransposón tipo SVA de 3 Kb de tamaño en la zona 3' no traducida del gen de la *fukutina*, lo cual da lugar a una reducción de los niveles de RNA mensajero (Watanabe *et al.*, 2005). Cuando los pacientes de FCMD son portadores de este retrotransposón y una mutación puntual en la zona codificante del gen de la *fukutina*, la enfermedad se desarrolla de forma más grave para el paciente a todos los niveles, encontrándose mayor afectación muscular, cerebral y ocular en ellos. Estos últimos casos empezaron a llamarse FCMD con un fenotipo tipo-WWS (WWS-like).

En un principio se pensó que no se encontraban individuos con mutaciones puntuales en ambos alelos del gen de la *fukutina* por letalidad embrionaria, aunque la verdadera causa era que no se encontraban porque estaban siendo buscadas en pacientes de FCMD. Trabajos posteriores revelaron simultáneamente dos pacientes con diagnóstico clínico de WWS, y que contenían mutaciones puntuales tipo “nonsense” o “sin sentido” en el gen de la *fukutina* en ambos alelos (de Bernabe *et al.*, 2003; Silan *et al.*, 2003). A partir de este momento el gen de la *fukutina* pasó a formar parte de la cohorte de genes que dan lugar a este síndrome. Hasta la fecha no se habían descrito más mutaciones en este gen en enfermos de WWS, a excepción de las presentadas en este trabajo de tesis doctoral. Sin embargo, muy recientemente, en un estudio mutacional que incluye 92 pacientes con alfa-distroglucanopatías, se encontró una



mutación de tipo “nonsense” en el gen de la *fukutina* en uno de los pacientes que fue diagnosticado de WWS (Godfrey *et al.*, 2007). En este mismo estudio aparecen por primera vez pacientes con mutaciones puntuales en ambos alelos del gen de la *fukutina*, cuyo fenotipo se cataloga como LGMD2.

4.2. Gen de función desconocida. Posibles funciones de la *fukutina*

La función de la *fukutina* es aún desconocida. El mRNA de la *fukutina* se expresa de forma ubicua, aunque su expresión es especialmente abundante en músculo esquelético, corazón y cerebro (Hayashi *et al.*, 2001). En su estructura se predice un único dominio transmembrana situado en su extremo N-terminal, y se localiza en el aparato de Golgi, al cual se ancla mediante este dominio. En un principio se le atribuyó un posible papel como glicosiltransferasa debido a que se observó homología de secuencia con glicosiltransferasas bacterianas (Aravind and Koonin, 1999). Sin embargo, análisis comparativos de secuencia de aminoácidos, sugieren la existencia otros dominios, como el LicD (Pfam PF04991), implicado en el metabolismo de la fosforilcolina, que podrían indicar una función distinta para esta proteína. Estos estudios se detallan en el apartado 2.2 de “Discusión”.

Una reciente publicación en la cual se realizan ensayos de interacción basados en ELISA (Ensayo de inmunoabsorción enzimática, en inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) y ensayos de inmunoprecipitación, indican la existencia de una interacción entre *fukutina* y α -DG, tanto en cerebro como en músculo esquelético (Yamamoto *et al.*, 2006). Un trabajo simultáneo propone una posible interacción entre *fukutina* y POMGnT1, sugiriendo un posible papel de la *fukutina* como moduladora de la actividad de POMGnT1, pudiendo incluso afectar a su localización subcelular. La mutación g.1223A>G, que da lugar a la sustitución p.Tyr371Cys descrita en un enfermo de FCMD (Kobayashi *et al.*, 2001), da lugar a la retención en el RE de la *fukutina*, impidiendo su paso al aparato de Golgi. Se ha comprobado que, cuando se realiza una cotransfección de POMGnT1 y *fukutina* con esta sustitución (p.Tyr371Cys), se observa localización de POMGnT1 en el RE (Xiong *et al.*, 2006).

Con respecto al fenotipo cerebral observado en enfermos de FCMD y WWS, se ha observado una expresión conjunta de los mRNAs de *fukutina*, *POMT1* y *POMGnT1* en



astrocitos y en neuronas inmaduras durante el desarrollo embrionario. Estos hallazgos sugieren una posible implicación de estas proteínas en procesos de migración neuronal (Yamamoto *et al.*, 2004). Por otra parte, en ratones quimeras para el gen de la *fukutina* procedentes de células ES^{FKTN^{-/-}} se han observado anomalías en la mielinización de los nervios periféricos y defectos en la formación de la sinapsis neuromuscular (Saito *et al.*, 2007). Estos sucesos demuestran la importancia de la *fukutina* en estos eventos y refirman su relevancia en procesos de migración neuronal.

4.3. Heterogeneidad fenotípica. Gen causante de alfa-distroglicanopatías

Además de las citadas FCMD y WWS, el gen de la *fukutina* da lugar a otras enfermedades de pronóstico menos grave. En el año 2006 salieron a la luz simultáneamente dos trabajos en los cuales se describían mutaciones en el gen de la *fukutina*, dando lugar a fenotipos que no concordaban ni con FCMD ni con WWS. En uno de estos trabajos se describía un nuevo tipo de LGMD en la cual los pacientes mostraban una respuesta favorable a esteroides, mejorando su debilidad muscular con este tratamiento (Godfrey *et al.*, 2006b). En el otro trabajo que apareció simultáneamente se mencionaban 6 enfermos que presentaban cardiomiopatías, además de una leve debilidad muscular (Murakami *et al.*, 2006a). En estos 6 enfermos, tanto la cardiomiopatía como la debilidad muscular se presentaron con distinto nivel de gravedad dependiendo del paciente, a pesar de tener en común la misma mutación. Así, en dos de los enfermos, hermanos y portadores de la misma sustitución p.Gly385Gln, la hermana presentó fallo cardiaco durante el embarazo, permaneciendo asintomática después, mientras que su hermano necesitó trasplante de corazón a la edad de 27 años. De los otros cuatro enfermos que presentaban la misma sustitución p.Ala179Thr, uno de ellos murió de fallo cardiaco a los 12 años de edad, mientras que el resto vivió largo tiempo sin dificultades graves en sus vidas. Ambos tipos de enfermos presentaban reducción en la glicosilación del α -DG.

Aparentemente, todos los pacientes con mutaciones en el gen de la *fukutina* muestran hipoglicosilación del α -DG. Esta hipoglicosilación se presenta en pacientes de FCMD, de WWS, de LGMD con respuesta a esteroides o de cardiomiopatías, observándose a mayor



nivel conforme aumenta la gravedad del fenotipo (Hayashi *et al.*, 2001; Silan *et al.*, 2003; Godfrey *et al.*, 2006b; Murakami *et al.*, 2006b). Por lo tanto, a la luz de estos trabajos, puede determinarse que aunque los fenotipos resultantes de las distintas mutaciones en el gen de la *fukutina* sean variables, todos pueden ser englobados en la categoría de alfa-distroglicanopatías.

En la Figura 6 se muestran, sobre una representación esquemática de la fukutina, todas las mutaciones que se han descrito hasta la fecha. Se han clasificado las mutaciones según el fenotipo al que dan lugar mediante un código de color.

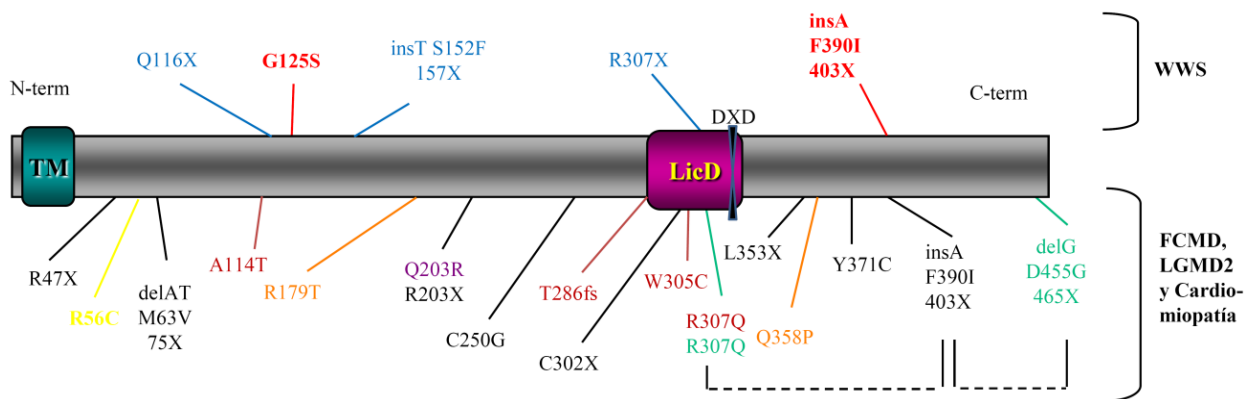


Figura 6. Representación esquemática de la fukutina. Se muestran el único dominio transmembrana y el dominio LicD (que contiene el motivo DXD). El extremo N-terminal se encuentra en el citoplasma celular y el C-terminal en el lumen de aparato de Golgi. Se han representado todas las mutaciones encontradas en la fukutina hasta la fecha. Las mutaciones que dan lugar a WWS se muestran en la parte superior de la representación, y aquellas que dan lugar a fenotipos menos graves en la parte inferior. En negro se muestran las mutaciones descritas en pacientes de FCMD en heterocigosis con el retrotransposón. El polimorfismo no sinónimo p.Q203R se muestra en morado, y en verde las mutaciones que dan lugar a un tipo de LGMD2 en heterocigosis con la mutación. insA_F390I_403X (conectadas mediante líneas discontinuas). En marrón se muestran las mutaciones p.R307Q y p.W305C en homocigosis y la mutación p.T286fs en heterocigosis con la mutación p.A114T, que han sido descritas en pacientes con LGMD sin retraso mental. En naranja se muestran las mutaciones que, en heterocigosis con el retrotransposón, dan lugar a cardiomiopatías. En amarillo se muestra una mutación hallada en un feto con lisencefalia tipo II. Las mutaciones que en homocigosis dan lugar a WWS se muestran en azul, y las descritas en este trabajo se muestran en rojo: la sustitución p.G125S tiene lugar en heterocigosis con la delección de la señal de poli(A) en la paciente 3.1, y la mutación insA_F390I_403X tiene lugar en homocigosis en el paciente 4.1.



5. OTROS GENES IMPLICADOS EN EL WWS

5.1. El gen *POMT2*

El gen *POMT2* localizado en 14q24.1, homólogo de *POMT1*, es también una glicosiltransferasa. El porcentaje de homología entre estos dos genes es del 40% en secuencia de nucleótidos y del 80% en secuencia de aminoácidos. La estructura predicha para *POMT2* sería similar a la postulada para *POMT1* (Figura 1), localizándose igualmente en el RE (Willer *et al.*, 2002).

Como se ha mencionado anteriormente, parece que *POMT1* y *POMT2* actúan de forma conjunta como un heterodímero (Akasaka-Manyá *et al.*, 2004; Manyá *et al.*, 2004). De acuerdo con esto, se ha comprobado posteriormente al primero de estos trabajos que mutaciones en el gen *POMT2* también dan lugar a WWS (van Reeuwijk *et al.*, 2005b). Sin embargo, se ha descrito un paciente con mutación en el gen *POMT2* que presenta una sintomatología compatible con un fenotipo de enfermedad MEB (Mercuri *et al.*, 2006). Esto podría deberse a que el cambio de aminoácido producido por la mutación no eliminase totalmente la actividad manosiltransferasa de *POMT2*, dando lugar a una sintomatología menos grave. Recientemente se ha publicado un trabajo en el cual se describen cuatro pacientes cuyo diagnóstico es de CMD con retraso mental, en los cuales se han hallado mutaciones en el gen *POMT2* (Yanagisawa *et al.*, 2007). Estos resultados expanden el fenotipo producido por mutaciones en el gen *POMT2* hasta alcanzar la gran variabilidad previamente observada para mutaciones en el gen *POMT1*.

Muy recientemente ha salido a la luz un trabajo en el cual se describe un enfermo diagnosticado de LGMD2, en el cual se han hallado mutaciones en el gen *POMT2* (Biancheri *et al.*, 2007). Sin embargo, en este paciente existe una gran diferencia con respecto a los pacientes diagnosticados de LGMD2 con mutaciones en el gen *POMT1*, y es la ausencia de afectación cerebral. Hasta la fecha, no se ha descrito ningún paciente con mutaciones en el gen *POMT1* como causa de enfermedad en el cual se haya descartado implicación cerebral, independientemente del fenotipo desarrollado.



5.2. El gen *FKRP*

El gen *FKRP*, localizado en 19q13.3 fue descrito por primera vez como causante de la distrofia muscular congénita tipo 1C (MDC1C) (Brockington *et al.*, 2001a). Durante el proceso de búsqueda de genes candidatos a causar algunas de las CMDs aún por caracterizar molecularmente, se realizó una búsqueda de genes homólogos al gen de la *fukutina*, ya que alguno de estos homólogos podría ser causante de alguna de estas variantes de CMDs. De esta forma se identificó el gen *FKRP* (*fukutin related protein*), que se describió como posible glicosiltransferasa por homología de secuencia de aminoácidos con el gen de la *fukutina* y con glicosiltransferasas bacterianas (Aravind and Koonin, 1999). Este gen resultó ser responsable de la citada enfermedad. Poco después, el mismo grupo evidenció que otro tipo de distrofia muscular, la LGMD2I, mapeaba en el mismo locus que la MDC1C, encontrándose como resultado de este trabajo mutaciones en el gen *FKRP* en enfermos de esta variante de distrofia muscular de pronóstico más leve (Brockington *et al.*, 2001b).

Este gen resultó ser el primero en mostrar una amplia variabilidad de fenotipos, ya que desde un principio se constató que mutaciones en el gen daban lugar a dos enfermedades distintas (la MDC1C y su variante alélica más suave, la LGMD2I). Poco después se amplió esta variabilidad fenotípica al demostrarse que también podía dar lugar a la enfermedad MEB y al WWS (Beltran-Valero de Bernabe *et al.*, 2004). La MDC1C y la LGMD2I comparten, al igual que las enfermedades causadas por los anteriormente citados genes, la hipoglicosilación del α -DG. En el trabajo desarrollado por Bernabé y colaboradores no se realiza estudio inmunohistoquímico, aunque es de esperar que la hipoglicosilación del α -DG ocurra también. Sin embargo, la contribución de este gen a las alfa-distroglicanopatías graves es minoritaria.

5.3. El gen *LARGE*

El gen *LARGE*, localizado en 22q12.3-q13.1 fue descrito por primera vez como parte de un fragmento del cromosoma 22 que suele estar deleciónado en diversos tipos de tumores, y fue clasificado como un nuevo miembro de la familia de *N*-acetilglucosaminiltransferasas por homología de secuencia (Ruttledge *et al.*, 1994; Peyrard *et al.*, 1999). Ya desde este



primer momento se comprobó que la expresión del mRNA de este gen es mayoritaria en cerebro, músculo esquelético y especialmente en corazón.

La primera evidencia de que mutaciones en este gen daban lugar a una distrofia muscular fue en el ratón miodistrófico (llamado *Large^{myd}*), en el cual una deleción espontánea en el gen *Large* murino da lugar a ratones de talla pequeña y postura anormal. Estos ratones presentan distrofia muscular y una corta esperanza de vida, además de cardiomiopatía y defectos en la migración neuronal que afectan al cerebro y al cerebelo (Grewal *et al.*, 2001).

La primera enfermedad atribuida a mutaciones en el homólogo humano de este gen (*LARGE*), fue un nuevo tipo de distrofia muscular congénita manifestada en una paciente que presentaba además retraso mental profundo y anomalías estructurales de carácter leve a nivel cerebral. Se observó además glicosilación anómala del α -DG. Esta nueva CMD fue denominada MDC1D, aunque este es el único caso descrito de la misma hasta la fecha (Longman *et al.*, 2003). Poco después se confirmó el papel de *LARGE* como glicosiltransferasa al demostrarse que la sobreexpresión de este gen en células de individuos afectados de FCMD, enfermedad MEB y WWS daba lugar a la recuperación de la glicosilación del α -DG, el cual además restauraba su función receptora de laminina, agrina y neurexina (Barresi *et al.*, 2004). Poco después también se demostró que la sobreexpresión del gen *Large* de ratón en células CHO Pro⁻⁵ (mutantes de glicosilación) dan lugar a la restauración funcional de la glicosilación del α -DG en estas células, y que este efecto se incrementaba al coexpresar el gen *POMGnT1* (Patnaik and Stanley, 2005).

La proteína *LARGE* posee dos dominios glicosiltransferasa, y muy recientemente se ha demostrado que una deleción intragénica en el gen *LARGE* da lugar a un fenotipo WWS (van Reeuwijk *et al.*, 2007), constatando este gen como el quinto gen causante de WWS, aunque, por el momento, con una escasa contribución al síndrome.

Se ha identificado un gen homólogo al gen *LARGE* humano, llamado *LARGE2*, que transfectado conjuntamente con el fragmento del gen *DAG1* correspondiente al α -DG en células HEK293T (células embrionarias de riñón, en inglés Human embryonic kidney), afecta a la maduración del α -DG en estas células de forma más efectiva que la propia proteína



LARGE (Fujimura *et al.*, 2005). Se ha comprobado que aunque *LARGE* se expresa de forma ubicua en muchos tejidos, no se ha detectado expresión de su homólogo *LARGE2* en cerebro, por lo que no es probable que la función de las proteínas a las que dan lugar sea redundante (Fujimura *et al.*, 2005).

A la vista de todos estos datos podemos concluir que:

Las mutaciones que resultan en la hipoglicosilación del α -dístroglicano han sido identificadas en genes que codifican glicosiltransferasas e hipotéticas glicosiltransferasas: *fukutina*, *FKRP*, *LARGE*, *POMGnT1*, *POMT1* y *POMT2*. Se ha comprobado que cinco de estos 6 genes pueden dar lugar a WWS cuando se encuentran mutados. Aun así, solamente un tercio de los enfermos de WWS descritos hasta la fecha han presentado mutaciones en alguno de estos cinco genes. Es necesario continuar con la búsqueda de otros posibles genes causantes del resto de los pacientes de WWS y otras patologías relacionadas para poder entender el mecanismo subyacente a ellas.

El presente trabajo presenta enfermos de WWS con mutaciones en dos de los genes con mayor prevalencia en este síndrome, el gen *POMT1* y el gen de la *fukutina*. Se proponen dos posibles efectos fundadores, uno para el gen *POMT1* en la población española de etnia gitana y otro para el gen de la *fukutina* en la población judía. Se analizan las bases moleculares de la enfermedad y se proponen nuevos genes candidatos que puedan ser responsables de esta patología en aquellos individuos aún por caracterizar molecularmente. También se analiza el comportamiento de las células inmortalizadas de un enfermo de WWS con mutación en el gen de la *fukutina*.

Objetivos



Cuando abordamos la tarea del diagnóstico molecular de enfermos de WWS, esta enfermedad era considerada como una patología de incidencia particularmente baja y de interés puramente científico. En años posteriores se ha demostrado que es una enfermedad genéticamente heterogénea causada por diversos genes, los cuales dan lugar a su vez a distintas enfermedades dependiendo de la mutación que tiene lugar en ellos. Por ello, los estudios que se realizan en cualquiera de estas patologías son útiles para el conocimiento general. Asimismo, estos estudios pueden ser de utilidad para los posibles avances en el tratamiento de este gran número de enfermedades, ya que algunas de ellas, al ser de carácter más leve podrían llegar a tener algún posible tratamiento si se amplía el conocimiento acerca de la función de los genes que las causan, entre los cuales se encuentran *POMT1* y *fukutina*.

El trabajo desarrollado en nuestro laboratorio podrá ser utilizado en el estudio de otras enfermedades, y podrá llegar incluso a ser útil en la prevención de la transmisión del WWS en particular en ciertas poblaciones.

En la presente tesis se ha abordado el estudio de las bases moleculares del WWS. Además se han realizado estudios de la enfermedad en células de un paciente. Los objetivos son los siguientes:

- Diagnóstico molecular de pacientes con WWS.
 - ❖ Búsqueda de mutaciones en genes conocidos.
 - ❖ Búsqueda de otros genes candidatos a ser responsables del WWS además de los actualmente descritos.
- Análisis de mutaciones en genes causantes de WWS con posible efecto fundador sobre ciertas poblaciones.
- Estudios funcionales llevados a cabo en células de enfermos de WWS, con el fin de analizar el comportamiento de las proteínas afectadas en esta enfermedad.

Materiales y Métodos



1. SUJETOS. DATOS FAMILIARES Y CLÍNICOS

1.1. Familia 1

Familia española procedente de Navarra (Figura 7a, página 65). El paciente 1.1 diagnosticado de WWS es una niña que presentó los siguientes síntomas: malformación tipo Dandy-Walker, hidrocefalia por quiste aracnoideo, agenesia parcial del cuerpo calloso, hipoplasia de los opérculos frontales, lisencefalia, heterotopias neuronales en el cerebro, quiste aracnoideo, microcefalia, comunicación interauricular e hipotonía.

1.2. Familia 2

Familia española procedente de La Línea de la Concepción, Cádiz (Figura 7b, página 65). El individuo 2.1 afectado de WWS es un niño que presentó los siguientes síntomas: malformación de Arnold-Chiari, encefalocele occipital, glaucoma, catarata congénita, hipotonía y fibrosis quística del páncreas.

1.3. Familia 3

Familia española procedente de Lérida (Figura 7c, página 65). El individuo 3.1 afectado de WWS es una niña resultado del primer embarazo de padres sanos y no consanguíneos de 30 y 32 años, respectivamente. El embarazo se desarrolló sin complicaciones y terminó prematuramente de forma espontánea a las 35 semanas de gestación. Se realizó una amniocentesis en la semana número 15 cuyo resultado fue un cariotipo normal 46, XX. Adicionalmente se realizó un cariotipo de alta resolución (550–850 bandas) tras el nacimiento de la paciente cuyo resultado no mostró anomalías, excluyendo por tanto la posibilidad de alteraciones cromosómicas superiores a 4 Mb. La recién nacida pesó 2,7 kg y su puntuación del test de Apgar fue de 7/9. Un primer examen mostró una cara dismórfica con orejas malformadas y de implantación baja (Figura 8a, página 66), hemivértebra torácica y defectos cardiacos. El examen TORCH descartó la existencia de infecciones congénitas. Las imágenes de la tomografía axial computarizada (TAC) mostraron superposición de los huesos del cráneo, una acusada microftalmia del globo ocular izquierdo, holoprosencefalia monolobar e hidrocefalia interna y externa



(Figura 8a). No se distinguen la corteza ni la sustancia blanca. No se observan detalles en la fosa posterior. En el cuarto día de vida la recién nacida comenzó a tener dificultades respiratorias y bradicardia, falleciendo al día siguiente. La autopsia reveló las siguientes anomalías: el aspecto medial del cerebro mostró un quiste interhemisférico, fusión de tálamos y de la *corpora quadrigemina*, ausencia del cuerpo calloso e hipoplasia del romboencéfalo. Se observaron hemorragias punteadas en el parénquima y se identificó ventriculitis. También se encontró un defecto del septo atrial (foramen oval), ventrículo subaórtico doble, hipoplasia del cuarto ventrículo, estenosis de la válvula pulmonar y transposición infundibular de los vasos mayores sin vena braquiocefálica. También se observó displasia retiniana.

1.4. Familia 4

Líneas celulares procedente del “*Coriell Institute for Medical Research*” (Camden, New Jersey) consistentes en linfoblastos inmortalizados del padre, la madre y el paciente afectado de WWS (Referencias: GM10180, GM10181 y GM10182). Las células proceden de una familia de judíos askenazíes (Figura 7d, página 65) cuyo hijo afectado, el paciente 4.1, es un niño que presentó los siguientes síntomas: ventriculomegalia con lisencefalia, defecto del hueso occipital con extrusión del SNC (encefalocele), microcórnea, microftalmia, cataratas y elevado nivel de creatina fosfoquinasa sérica. El cariotipo fue normal. Nos pusimos en contacto con el *Coriell Institute* a fin de obtener más datos que resultasen importantes para la confirmación del diagnóstico, tales como la edad a la que falleció este paciente. Sin embargo, dado que el anonimato está garantizado en estos casos, nos ha sido imposible ampliar información aparte de la inicialmente suministrada.

1.5. Familia 5

Familia española de etnia gitana. Se desconoce su procedencia geográfica. En esta familia se encuentran dos individuos afectados (5.1 y 5.4), hijos de padres consanguíneos primos segundos (parentesco de tercer grado, Figura 7e, página 65).

El individuo 5.1 es un recién nacido varón de peso 2,9 kg y puntuación del test de Apgar de 5/7. Presentó desde el nacimiento hipotonía muscular profunda con ausencia de



movimientos, contracturas articulares y arreflexia. Su valor de CPK sérica fue de 8.400 UI/L. En el examen ocular se observó retromicrognatia, orejas de implantación baja, microftalmia, cataratas, microcórneas y displasia retiniana. La resonancia magnética craneal reveló las siguientes anomalías: lisencefalia tipo II, hidrocefalia, agenesia del cuerpo calloso, alteración de la mielina, hipoplasia del cerebelo y del tronco cerebral y variante de malformación de Dandy-Walker (Figura 8b, página 66). Se puso derivación ventrículo-peritoneal (DVP) como tratamiento para la hidrocefalia. Se realizó una biopsia muscular en la que se observó músculo distrófico (Figura 9c, página 67) aunque la tinción para la merosina resultó normal (Figura 9d). El paciente falleció a los 4 meses.

El individuo 5.4 fue también un varón, nacido mediante cesárea. Su peso fue de 3,5 kg y tuvo una puntuación en el test de Apgar de 7/8, presentando ya desde el nacimiento hipotonía paralítica grave, y un valor de CPK sérica de 6.000 UI/L. El examen ocular reveló microftalmia y se observó que presentaba un aspecto parecido al de su hermano. La resonancia magnética craneal reveló anomalías similares a las del individuo 5.1. En este paciente no se realizó biopsia muscular. No hay muestras biológicas de este paciente. No se tiene constancia de su fallecimiento.

1.6. Familia 6

Familia española de etnia gitana. También se desconoce su procedencia geográfica. El enfermo (individuo 6.1) es hijo de padres dobles primos hermanos (grado de consanguinidad 2° + 3°, Figura 7f, página 65). El recién nacido es un individuo de sexo masculino nacido mediante cesárea, de peso 3,4 kg y con una puntuación en el test de Apgar de 8/9. Presentó desde el nacimiento hipotonía paralítica profunda con escasez de movimientos espontáneos y contracturas articulares múltiples. Su valor de CPK sérica fue de 40.851 UI/L. El examen ocular reveló microftalmia, neovascularización de iris, restos de membrana pupilar, displasia y desprendimiento bilateral de retina. También se observó hipertelorismo, frente abombada y orejas de implantación baja. La resonancia magnética craneal mostró lisencefalia, hidrocefalia, agenesia del *septum pellucidum* y de la parte posterior del cuerpo calloso, heterotopias periventriculares nodulares y subcorticales en banda, hipoplasia cerebelosa y de tronco cerebral, y megacisterna magna (Figura 8c, página 66). Se realizó una biopsia muscular y la tinción HE mostró un músculo muy



desestructurado con patrón distrófico (Figura 9e, página 67), aunque con tinción de merosina normal (Figura 9f). El paciente falleció a los 10 días de vida.

1.7. Familia 7

Familia española procedente de Salamanca. El individuo afectado es el primer hijo, nacido tras un parto sin alteraciones, de padres sanos y no consanguíneos (Figura 7g, página 65). El paciente 7.1 es un varón que presentó los siguientes síntomas: hipotonía muscular con escasez de movimientos, contracturas en rodillas y valor de CPK sérica de 4.403 UI/L, análisis repetido en diversas ocasiones con resultados que han sido siempre superiores a 2.000 UI/L. El examen ocular mostró asimetría en tamaño de los globos oculares, nistagmo, vascularización coroidea anómala, lesiones lacunares retinianas y pigmentación retiniana anormal. Se le realizó una resonancia magnética craneal que reveló las siguientes anomalías: paquigiria bihemisférica de predominio frontal, ventriculomegalia, alteración de la sustancia blanca, ausencia del *septum pellucidum*, adelgazamiento o hipoplasia de tronco cerebral e hipoplasia de los nervios ópticos y del quiasma (Figura 8d, página 66). Se le realizó una biopsia muscular que reveló, tras la tinción HE, alteraciones leves con variabilidad en el tamaño de las fibras musculares pero sin patrón distrófico acusado (Figura 9g, página 67) y tinción de merosina normal (Figura 9h). El paciente tiene actualmente 7 años, retraso mental profundo, amaurosis, hipotonía axial, espasticidad de miembros, no controla la cabeza ni es capaz de mantenerse sentado o en bipedestación. El último análisis de CPK sérica ha dado como resultado un valor de 2.821 UI/L. Aunque los síntomas que presenta este paciente no parecen llegar al grado de afectación que suelen presentar los enfermos de WWS, se le ha incluido en este estudio por considerarse un caso atípico de WWS concordante con la sintomatología de una distroglicanopatía.

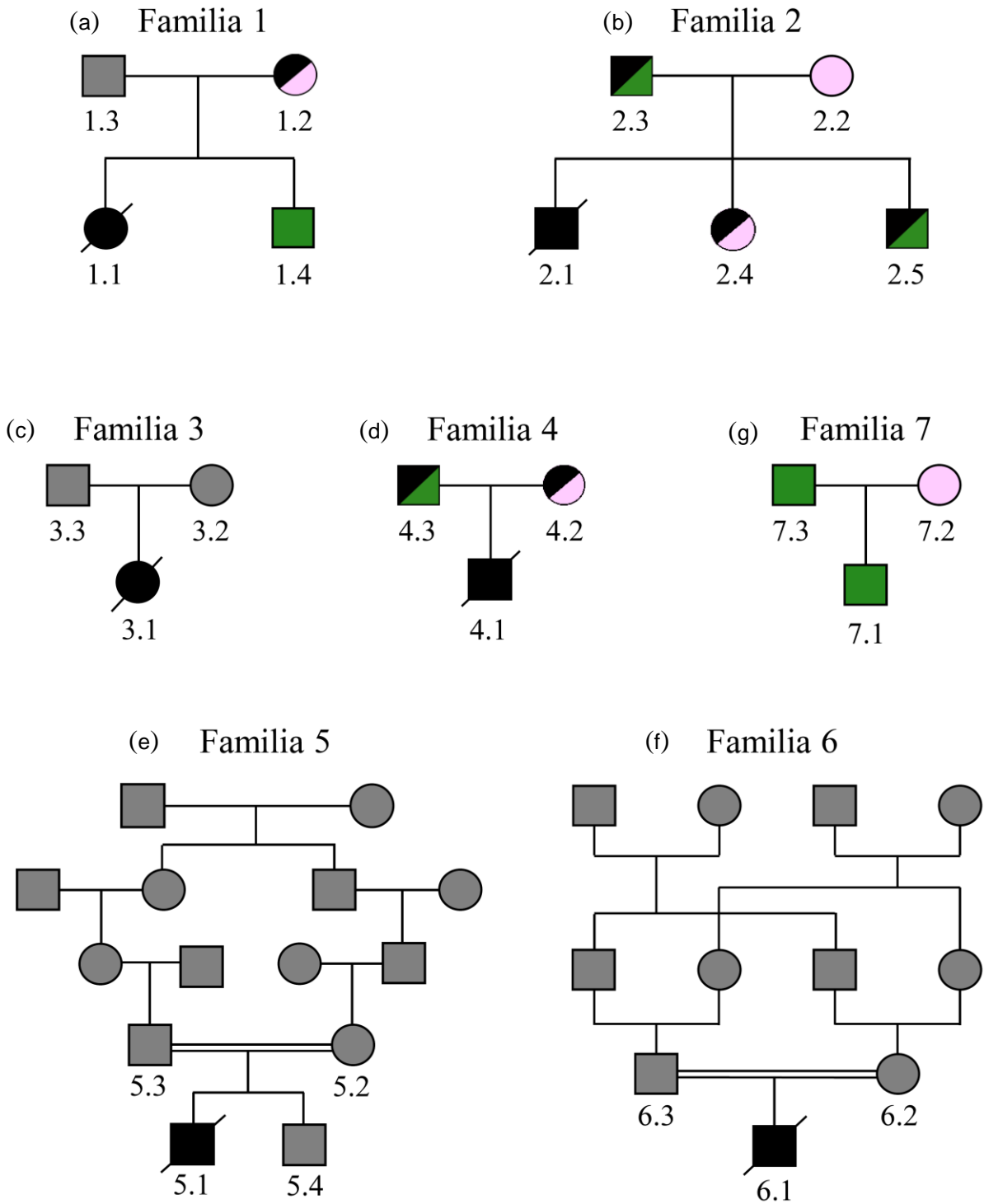


Figura 7. Árboles genealógicos de todas las familias implicadas en el presente trabajo. Se representan en verde y rosa aquellos miembros de las familias de los cuales se tiene material genético y con una mitad en negro aquellos que han resultado ser heterocigotos para la mutación detectada en la familia en cuestión. En gris se representan los miembros de las familias de los cuales no se tiene material a analizar; se han incluido para poder hacer visible la genealogía y con ello el patrón de consanguinidad (familias 5 y 6).

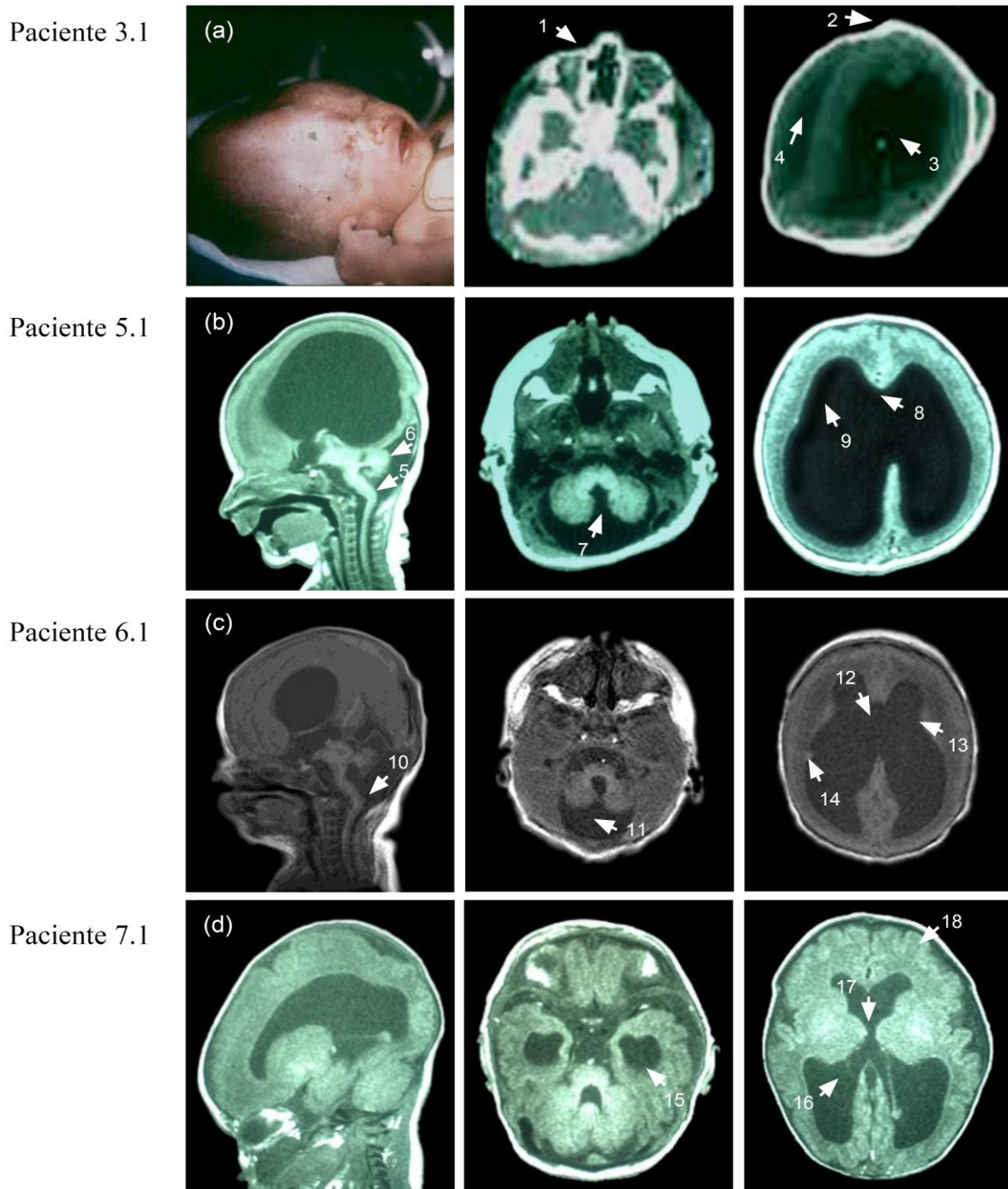


Figura 8. TAC y RMN de los pacientes 3.1, 5.1, 6.1 y 7.1; donde las anomalías se detallan con flechas numeradas. (a) En la paciente 3.1 la fotografía clínica muestra malformación del cráneo y de las orejas, que son de implantación baja. En el TAC se observa hipoplasia del globo ocular izquierdo [1], superposición de los huesos del cráneo [2], e hidrocefalia dentro [3] y fuera [4] de la corteza cerebral. (b) En el paciente 5.1 se observa una flexura llamativa de la unión bulbo-medular [5], e hipoplasia del cerebelo [6] y [7]. También se observa ausencia del septum pellucidum [8] y señal anómala de la mielina [9]. (c) En el paciente 6.1 se observa de nuevo la flexura llamativa de la unión bulbo medular [10], y la hipoplasia del cerebelo [11]. Se observa de nuevo la ausencia del septum pellucidum [12], la señal anómala de la mielina [13] y heterotopias neuronales [14]. (d) En el paciente 7.1 se observa ventriculomegalia [15,16] y ausencia del septum pellucidum [17]. También se observa paquigiria [18].

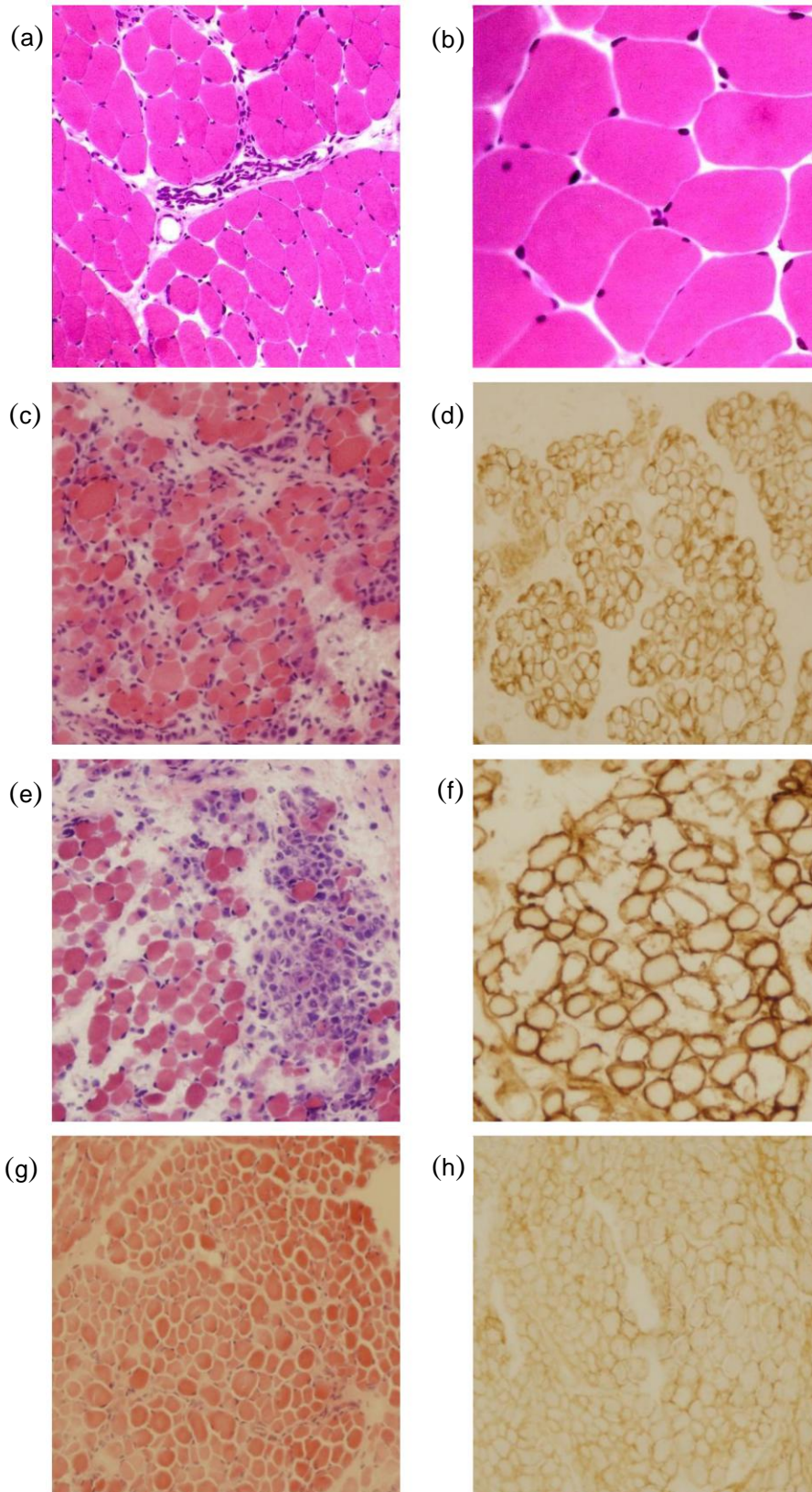


Figura 9. Tinciones HE y merosina de los pacientes 5.1, 6.1 y 7.1 del presente estudio. (a y b) Tinción HE de un músculo sano a distintos aumentos (20x y 63x, respectivamente). (c) Tinción HE del paciente 5.1 a 20x. Se observa aumento leve del tejido conectivo endomysial, variabilidad en el tamaño de las fibras, algunas fibras necróticas y numerosas fibras regenerativas basófilas. (d) La tinción de merosina es normal en el paciente 5.1. (e) Tinción HE del paciente 6.1 a 10x en el que se observa un aumento marcado del tejido conectivo endomysial y gran foco de fibras basófilas regenerativas. (f) Tinción de merosina normal para el paciente 6.1. (g) HE del paciente 7.1 a 20x en el que se observa un leve aumento del tejido conectivo endomysial y variabilidad en el tamaño de las fibras. (h) Técnica IHQ para la tinción de merosina en este paciente, que es normal.



2. ANÁLISIS MOLECULAR DE GENES CANDIDATOS:

2.1. Elección de genes candidatos

Se han analizado las secuencias de genes que podrían estar implicados en la patología del WWS. Como se cita en “Introducción”, hasta la fecha se han descrito en total 5 genes responsables del WWS: *POMT1*, *POMT2*, *fukutina*, *FKRP* y *LARGE*. Tres de estos cinco genes se han analizado en el presente estudio: *POMT1*, *POMT2* y *fukutina*, además de los genes *DNAJB6*, *DNAJB11* y *CRYAB* por razones que se detallarán en “Resultados”.

A la hora de realizar el estudio molecular se han analizado las secuencias codificantes completas de los genes, así como las regiones intrónicas flanqueantes con el fin de observar posibles fallos en las zonas de unión intrón-exón, las zonas promotoras y las regiones donde se encuentra la señal de poliadenilación. En cuanto al orden de elección de genes para el análisis molecular y secuenciación, siempre se ha comenzado el estudio por el gen *POMT1*, ya que fue el primero descrito y sigue siendo el responsable del mayor número de casos de WWS. La segunda opción ha dependido de cada caso de estudio.

2.2. Extracción de material genético

El material genético a analizar ha sido extraído a partir de muestras de sangre, células en cultivo o tejido muscular congelado, dependiendo de cada familia. En las familias 1, 2 y 7 el DNA genómico (DNAg) fue extraído a partir de sangre periférica utilizando para ello el *Nucleon extraction and purification kit* (Amersham Biosciences). Este mismo kit se utilizó para la obtención de DNAg a partir de células en cultivo de la familia 4. Para la obtención de RNA total de estas células se utilizó el *QIAamp Mini kit* (Qiagen). El DNAg de la paciente 3.1 nos fue remitido directamente del hospital donde fue diagnosticada y tratada. Desconocemos el procedimiento utilizado para su extracción. Para la obtención de DNAg y RNA total a partir de tejido muscular esquelético congelado de los pacientes 5.1 y 6.1 se utilizó el *Masterpure complete DNA and RNA purification kit* (Epicentre Biotechnologies).



2.3. Transcripción de RNA total a cDNA. RT-PCR

El cDNA de la familia 4 y de los pacientes 5.1 y 6.1 se obtuvo mediante retrotranscripción, utilizando como enzima la transcriptasa en reverso *MMLV* (*Moloney murine leukemia virus*, Invitrogen). Partiendo de 500 ng de RNA total, la reacción se realizó en un volumen final de 20 μ l con 10 ng de hexanucleótidos al azar; 50 U de inhibidor de RNasa; 10 μ M DTT y 200 U de enzima. Se realizó un primer paso de desnaturalización del RNA a 65 °C durante 10 minutos, tras lo cual se realizó una incubación de 5 minutos en hielo. La reacción de retrotranscripción se realizó a 42 °C durante 1 hora, tras lo cual se inactivó la enzima a 95 °C durante 5 minutos. Se partió de volúmenes de 2 ó 3 μ l de estas reacciones para realizar las amplificaciones de cDNA.

2.4. Amplificación mediante PCR

Con la ayuda de los programas informáticos OLIGO 4.0 Y OLIGO 6.8 se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación de todas las zonas relevantes como son los exones, las uniones intrón-exón, las secuencias promotoras y las regiones donde se encuentran las señales de poliadenilación de los genes candidatos. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con 100 ng de DNAg en un volumen final de 25 μ l según la siguiente mezcla de reacción: 0,2 mM de cada oligonucleótido, 800 μ M de dNTPs, 0,625 U de Taq DNA polimerasa termoestable *Ecotaq* (Ecogen) y concentraciones variables de $MgCl_2$ variando desde 1,5 hasta 2,5 mM (dependiendo de la pareja de oligonucleótidos empleada) en un termociclador modelo PTC-100 (Peltier Thermal Cycler, M.J. Research).

El programa de PCR dependió de cada pareja de oligonucleótidos, siendo los pasos comunes los que se detallan a continuación:



Paso 1	Desnaturalización	94 °C		5 min
	Paso 2 (desnaturalización)	94 °C	30 seg	35 ciclos
	Paso 3 (anillamiento)	Tm	30 seg	
	Paso 4 (elongación)	72 °C	30 seg a 1 min	
Paso 5	Elongación final	72 °C		7 min

*Tm: temperatura de anillamiento específica de cada pareja de cebadores utilizada

El tamaño de los fragmentos amplificados se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio, cuyo porcentaje varió en función del tamaño amplificado, desde 0,8 % hasta 2 %, visualizándose las bandas a la luz ultravioleta.

2.5. Cebadores empleados para la amplificación y secuenciación

A lo largo del presente trabajo se han empleado una gran cantidad de cebadores, ya que el proceso de amplificación y secuenciación se ha realizado independientemente para cada exón y para múltiples genes. La enumeración de todos estos cebadores ocuparía un espacio muy extenso, por lo que se han decidido omitir. Las secuencias de los cebadores empleados para la amplificación y secuenciación de todos los genes analizados en este trabajo están disponibles a petición. En la siguiente tabla se detalla la secuencia de los cebadores empleados en las reacciones de amplificación y secuenciación llevadas a cabo en el cDNA en los individuos 5.1 y 6.1 detallada en el apartado 2.1.3.1 de “Resultados”.

Tabla 2. Secuencia de los cebadores empleados en el análisis del cDNA de los pacientes 5.1 y 6.1

Nombre cebador	Secuencia
21D	5' GGGCAGTACATCTCTTTTACA 3'
9R	5' CTGATTCCAAAAGCATTAGC 3'
i4D	5' ATGACGGCGCTATGTGAAAG 3'
i4R	5' TGGACTCAGATTAATAAGGCACAG 3'



2.6. Secuenciación directa

Los productos de PCR se purificaron mediante el *GFX DNA and gel band purification kit* (Amersham Pharmacia Biotech) y fueron posteriormente secuenciados en un secuenciador ABI PRISM[®] 3130xl *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). El análisis mutacional de las secuencias se realizó mediante el programa informático *Gene Jockey II* para Macintosh. Para la secuenciación se emplearon 200 ng/100 pb del producto amplificado y purificado, y 5 pmol del cebador a partir del cual se quiere secuenciar.

2.7. Análisis de endonucleasas de restricción

Las variaciones de secuencia c.2098G>A, c.586G>A y g.3545 G>T encontradas en el gen *POMT1* y el cambio c.373G>A encontrado en el gen de la *fukutina* generan nuevos sitios de restricción para *BfmI*, *NmuCI*, *BveI* y *AluI*, respectivamente. Se comprobó si estas variaciones se encontraban presentes en más de 100 individuos sanos mediante análisis de corte con enzimas de restricción. Estos cambios no se encontraron registrados en bases de datos humanas de SNPs, ESTs o “trace” (secuencias traza).

2.8. Ensayo de Southern blot

Se realizaron dos ensayos de Southern blot distintos para explorar posibles alteraciones en el gen *POMT1* que no pudiesen ser detectadas por secuenciación. En el primer ensayo se empleó únicamente material genético de los miembros de la familia 2 además de un individuo control. En el segundo ensayo se incluyó DNA de los individuos 2.2, 2.3, 2.4, 1.4, de los miembros de la familia 7, y de dos individuos control (C1 y C2).

2.8.1. Preparación y marcaje de las sondas

Las sondas utilizadas se obtuvieron mediante la amplificación por PCR del cDNA de *POMT1* que se encontraba clonado en dos plásmidos distintos.

Para el ensayo 1 se utilizó como sonda un fragmento del cDNA de *POMT1* que abarca desde el ATG iniciador hasta el codón de terminación final TAG, con una longitud de 2,4 kb, que se encuentra clonado en el plásmido pBluescript II KS. El producto de PCR



fue purificado de gel (kit *GFX*, Amersham) y marcado con DIG-11-dUTP mediante el método “Random Primed Labeling”. La detección se hizo mediante quimioluminiscencia, utilizando para ello el anticuerpo *anti-Digoxigenin-AP Fragments*, anticuerpo anti digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina, y CSPD (Disodio 3-(4-metoxispiro {1, 2-dioxetano-3, 2' (5'cloro) triciclo [3.3.1.1.^{3,7}] decano}-4-il) fenil fosfato) como sustrato quimioluminiscente para la fosfatasa alcalina (ambos reactivos de la casa comercial Roche Diagnostics).

Para el ensayo 2 la sonda utilizada abarcó el cDNA de *POMT1* completo, desde el nucleótido +1 del exón 1 no codificante hasta el nucleótido 3.126 final de la zona 3' no traducida del exón 20. El tamaño de la sonda para el ensayo 2 fue de 3,1 kb. Esta sonda también ha sido generada mediante amplificación por PCR a partir del cDNA completo de *POMT1* que se encuentra clonado en el plásmido pCMV-SPORT6. El fragmento amplificado fue purificado de gel y marcado radiactivamente con 50 μ Ci de [α -³²P] dCTP, utilizando el kit *RediprimeTM II Random Prime Labeling System* (Amersham Biosciences) siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.8.2. Digestión mediante endonucleasas de restricción y transferencia a membranas

Para ambos ensayos el procedimiento fue similar, exceptuando las endonucleasas de restricción utilizadas, que en el ensayo 1 fueron *Bfr*BI, *Bsp*LU11I y *Xba*I, mientras que en el ensayo 2 se utilizaron las endonucleasas *Dra*I, *Eco*T22I+*Nco*I y *Eco*RV+*Hind*III. El procedimiento fue el que se detalla a continuación:

10 μ g de DNA genómico fueron digeridos O/N con 40 U de las endonucleasas correspondientes en un volumen final de 150 μ l. Se comprobaron las digestiones en un gel de agarosa y se encontraron satisfactorias excepto las correspondientes al DNA del padre 2.3. En ambos casos se repitió la digestión y pareció digerirse al completo. Se precipitaron las digestiones con etanol 100 % y NaAc 3M pH: 5,2 y se resuspendieron en 25 μ l de TBE 1x (el mismo con el cual se realizó la electroforesis). Se cargaron las muestras en un gel de agarosa *Certified Molecular Biology Agarose* (BIO-RAD) al 0,8 % y se eligieron como marcadores de peso molecular *1 kb DNA ladder* y *Lambda DNA/HindIII Fragments*



(Invitrogen). La transferencia de DNA se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Sambrook y Russell (2001) a membranas de nylon *Zeta ProbeGT Genomic Tested Blotting Membranes* (BIO-RAD).

2.9. Análisis mediante MLPA (Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación)

Se utilizó el *SALSA-MLPA kit p061 Lissencephaly* (MRC-Holland) para rastrear una posible delección en el gen *POMT1* como ensayo adicional al Southern blot. Este kit incluye una colección de sondas que abarca diversos genes relacionados con la lisencefalia, entre los cuales se encuentra el gen *POMT1*. En concreto sólo se incluyen sondas pertenecientes a los exones 2, 5, 17 y 19 de *POMT1*, por lo que si ocurriese una delección intragénica que se encontrase entre cualquiera de estos intervalos no sería detectada mediante este sistema. Sin embargo, nos pareció oportuno realizar el test para descartar una posible delección grande del gen que abarcase varios exones y que podría verse reflejada con este ensayo. Además, se descartaban el resto de los genes incluidos en este kit para la lisencefalia: *LISI*, *DCX*, *POMGnT1* y *FLNA*.

2.10. Cuantificación de la expresión del gen de la *fukutina*. RT-PCR cuantitativa.

Se llevaron a cabo dos experimentos de RT-PCR cuantitativa para el gen de la *fukutina*. En estos experimentos se analizó la expresión cuantitativa del mRNA de la *fukutina* en las células GM10180, GM10181 y GM10182, correspondientes al individuo afectado (4.1) y a sus padres (4.2 y 4.3 respectivamente). Como controles de expresión se utilizó RNA total de células HEK293T, células Jurkat (linfocitos T de leucemia humana) y células SH-SY5Y (neuroblastoma humano). Estos experimentos fueron llevados a cabo con el *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* según las indicaciones del fabricante, en un termociclador *2720 Thermal Cycler*. El equipo utilizado para la PCR cuantitativa fue el *7900 Fast Real-Time PCR System* con los siguientes cebadores marcados con SYBR Green *Power SYBR Green PCR Master Mix*:



Tabla 3. Cebadores empleados en el ensayo de RT-PCR cuantitativa

Nombre cebador	Secuencia
FK-D	5' TTTTCTGTGTTCCAAGAGACTTTACTG 3'
FK-R	5' AGCCTTCCTCATTCTTCCATAGGAAGGCT 3'

Programa de amplificación:

Paso 1	Desnaturalización	95 °C		10 min
	Paso 2 Desnaturalización	95 °C	15 seg	40 ciclos
	Paso 3 Anillamiento y elongación	60 °C	1 min	

Los datos han sido analizados utilizando el programa SDS 2.2.2. Este programa, todos los reactivos y el termociclador son de la casa comercial Applied Biosystems.

3. ANATOMÍA PATOLÓGICA. ESTUDIO PROTEICO

3.1. Extracción de proteína total de tejidos y células

Los extractos de proteína total de tejidos se hicieron a partir de 100 mg de tejido muscular congelado. Los tejidos fueron lisados con ayuda de N₂ líquido en morteros de porcelana. Posteriormente se añadió al lisado la mezcla de lisis que consiste en un tampón conteniendo 50 mM Tris-HCl a pH=8, 100 mM NaCl, 1 % Tritón X-100 y 0,1 % SDS al que se le añaden los siguientes inhibidores de proteasas: 0,1 mM PMSF, 10 µg/ml antipaína, 0,5 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml pepstatina, 2 µg/ml aprotinina y un cocktail de antiproteasas, *Complete Mini* (Roche Diagnostics).

La extracción de proteína total de células en cultivo se llevó a cabo mediante homogeneizadores Potter Elvehjem de vidrio. Una cantidad que ha oscilado entre 10-30x10⁶ células se resuspendieron en la mezcla de lisis (consistente en la mezcla del tampón con todas los inhibidores de proteasas) y se lisaron mecánicamente en el homogeneizador hasta observar disgregación de las células al microscopio óptico.



Ambos procedimientos de lisis, tanto de tejidos como de células en cultivo, son llevados a cabo en hielo para evitar degradación proteica. Los lisados resuspendidos en la mezcla de lisis se incuban durante 15 minutos en hielo y se centrifugan a 4 °C durante 15 minutos a 15.000 rpm. Tras la centrifugación se recoge el sobrenadante que contiene la fracción de proteína total y se conservan a -70 °C. Los extractos proteicos se cuantifican mediante el método colorimétrico de Bradford.

3.2. Ensayo de Western blot

Los ensayos de Western blot se realizaron utilizando el sistema de electroforesis de proteínas *Mini-PROTEAN[®] 3 cell* (BIO-RAD). El porcentaje de los geles de acrilamida varió en función de la proteína a detectar en cada caso. Se utilizaron geles del 6 %, 7 % y 10 %, dependiendo del tamaño molecular de la proteína a detectar y de 0,75 ó 1,5 mm de espesor dependiendo del volumen de muestra a cargar. Cantidades de 30 a 100 µg de proteína se sometieron a electroforesis SDS-PAGE en geles de acrilamida y se transfirieron a membranas de PVDF *Immobilion-P 0,45µm* (Millipore) en tampón tris-glicina durante 2 horas a T^a ambiente, a 150 mA los geles de 0,75 mm, y a 257 mA los de 1,5 mm. Como solución de bloqueo se utilizaron alternativamente soluciones de BSA (SIGMA) al 3 % o de leche en polvo desnatada al 5 % en TBS-T, dependiendo del anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios se incubaron O/N a 4 °C y los secundarios 1 hora a T^a ambiente. Tras la incubación con anticuerpos se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-T. La detección se realizó utilizando el kit *ECL* (Amersham Biosciences).

3.2.1. Laminin Overlay (Revestimiento con laminina)

El fundamento de esta técnica se basa en la afinidad que tiene la merosina (laminina de tejido muscular) por el α -DG glicosilado. Una vez realizada la transferencia de los extractos proteicos a las membranas de PVDF, se incuban O/N a T^a ambiente con 10 mg/ml de merosina en solución de bloqueo de BSA al 3 % en TBS-T. Al incubar la merosina con las membranas, ésta sólo se unirá a los residuos glicosídicos del α -DG. Posteriormente se incuban las membranas con el anticuerpo primario anti-laminina, que



detectará tanto la merosina propia de los tejidos como la merosina que se ha unido al α -DG glicosilado y que, por lo tanto, se encuentra en el tamaño molecular correspondiente a éste. Posteriormente se realizan los lavados del anticuerpo primario, y se procede a partir de este punto de manera idéntica a la detallada para el ensayo de Western blot.

3.3. Ensayo de inmunofluorescencia en células

Para la inmunofluorescencia en células se utilizaron laminillas cubreobjetos redondas de vidrio de 12 mm de diámetro (Marenfeld GmbH). En el caso de células adherentes como las SH-SY5Y y C2C12, previamente al sembrado se colocaron los cubreobjetos en el fondo de las placas de cultivo celular, con el fin de que se adhiriesen a ellos. Se sembraron las células en las placas a una confluencia del 60 % y se dejaron crecer 24 horas antes de hacer la inmunofluorescencia. El tiempo de crecimiento se aumenta hasta las 72 horas en el caso de que la proteína a detectar se haya transfectado en las células. En el caso de las células que crecen en suspensión, como los linfoblastos procedentes del *Coriell Institute*, fue necesario tratar los cubreobjetos con poli-L-lisina para que se quedasen fijadas a ellos. El tratamiento se realizó con un porcentaje 1:10 del compuesto *poly-L-lysine* (SIGMA) O/N, tras lo cual se lavaron tres veces con PBS 1x. En cada cubreobjeto tratado de esta forma se incubaron 3×10^4 células, suspendidas en un volumen de 25 μ l durante 2 horas, tiempo en el cual se adhirieron a los cubreobjetos.

El protocolo de la inmunofluorescencia seguido para todos los tipos celulares es el que se detalla a continuación: fijación de las células con paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos, 3 lavados de 5 minutos con PBS 1x, permeabilización con Tritón X-100 al 0,2 % durante 20 minutos, bloqueo con 3 % BSA en PBS 1x durante 1 hora. Tras el bloqueo se realiza una incubación con el anticuerpo primario durante 1 hora, incubación con el anticuerpo secundario durante 30 minutos en oscuridad, tinción nuclear con DAPI en PBS 1x y finalmente, montaje de los cubreobjetos sobre portaobjetos, utilizando *Prolong gold antifade reagent* (Molecular Probes) como medio de montaje. Todas las incubaciones se realizaron a T^a ambiente. Tras cada incubación con anticuerpo se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1x.



3.4. Ensayo de inmunofluorescencia en tejidos

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en tejidos de pacientes. Las tinciones se realizaron sobre criosecciones de 10 μm de grosor cortadas en un criostato *Leica Cryocut 1900* (Leica Microsystems). El protocolo seguido es el que se detalla a continuación: fijación de los tejidos con una solución conteniendo 80 % metanol y 20 % acetona durante 20 minutos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, incubación durante 40 minutos en medio de bloqueo consistente en 0,3 % Tritón X-100; 5 % NGS (suero normal del cabra o de la especie donde esté hecho el anticuerpo secundario); 3 % BSA en PBS 1x, incubación con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante 1 hora en cámara húmeda, incubación con anticuerpos secundarios diluidos en PBS 1x durante 30 minutos de la misma forma que los primarios y en oscuridad, y tinción de los núcleos con DAPI en PBS 1x. Tras este proceso, se realiza el montaje con el medio *Prolong gold antifade reagent*. Todas las incubaciones excepto la fijación, se realizaron a T^{a} ambiente. Tras cada incubación se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS 1x.

Ambos tipos de inmunofluorescencias han sido observadas en un Microscopio Confocal Espectral Leica TCS SP2 perteneciente al Servicio Interdepartamental de Investigación (SIIdI) de la U.A.M.

3.5. Anticuerpos primarios

Anti-POMT1 (SP26). Anticuerpo producido en conejo, usando un péptido sintético conjugado a KLH (keyhole limpet hemocyanin), correspondiente a los aminoácidos 510-524 (VEEHRYGASQEQRER) de POMT1. Utilizado en inmunofluorescencia (IF) (1:25) (producido y purificado por encargo a la casa comercial Eurogentec).

Anti-calnexina. Anticuerpo policlonal producido en conejo y utilizado en IF (1:200) (Stressgen Bioreagents Corporation).

Anti-laminina. Anticuerpo policlonal producido en conejo y utilizado en Western blot (WB) (1:1.000 en la técnica del revestimiento con laminina o “laminin overlay”) y en IF (1:200) (SIGMA).



Anti- α -dístroglicano (VIA-4). Anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce residuos glicosídicos del α -dístroglicano. Utilizado en WB (1:1.000) e IF (1:100) (Upstate Biotechnologies).

Anti- α -dístroglicano (IIH-6). Anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce residuos glicosídicos del α -dístroglicano. Utilizado únicamente en IF (1:100) (Upstate Biotechnologies).

Anti- α -dístroglicano (α DAG). Anticuerpo policlonal producido en oveja que reconoce la zona proteica cercana al C-terminal (PDRSHVKGKHEYFMYATDKGG) del α -dístroglicano del pollo. Utilizado únicamente en IF (1:25). Cedido amablemente por el Dr. Kröger (Instituto de Fisiología, Universidad Ludwig-Maximilian, Múnich, Alemania). Actualmente, en nuestro laboratorio, estamos generando un nuevo anticuerpo contra la zona peptídica central del α -DG humano.

Anti- β -Dístroglicano (β -DG, 43DAG1/8D5). Anticuerpo monoclonal de ratón utilizado en WB (1:1.000) e IF (1:25) (Vector Laboratories).

Anti-FLAG M2. Anticuerpo monoclonal de ratón y que reacciona contra el epítipo “FLAG” presente en muchos plásmidos de expresión en células eucariotas. Utilizado en IF (1:200) (Stratagene).

Anti-c-myc. Anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce el epítipo “9E10” (secuencia EQKLISEEDL) derivada de la proteína c-myc humana, presente en muchos plásmidos de expresión en células eucariotas. Usado en IF (1:100) (Roche Diagnostics).

3.6. Anticuerpos secundarios

Anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa. Producido en cabra y utilizado en WB (1:10.000) (Nordic).

Anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa. Producido en cabra y utilizado en WB (1:10.000) (Nordic).

Anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa. Producido en burro y utilizado en WB (1: 20.000) (Santa Cruz Biotechnology).



Alexa Fluor 488 Anti-IgG de ratón. Producido en cabra y acoplado a un fluorocromo que emite en verde. Utilizado en IF (1:500) (Molecular Probes).

Alexa Fluor 488 Anti-IgG de conejo. Producido en cabra y acoplado a un fluorocromo que emite en verde. Utilizado en IF (1:500) (Molecular Probes).

Alexa Fluor 488 Anti-IgG de oveja. Producido en burro y acoplado a un fluorocromo que emite en verde. Utilizado en IF (1:500) (Molecular Probes).

Alexa Fluor 594 Anti-IgG de ratón. Producido en cabra y acoplado a un fluorocromo que emite en rojo. Utilizado en IF (1:500) (Molecular Probes).

Alexa Fluor 594 Anti-IgG de conejo. Producido en cabra y acoplado a un fluorocromo que emite en rojo. Utilizado en IF (1:500) (Molecular Probes).

4. CULTIVOS CELULARES

Todas las líneas utilizadas se han sembrado y crecido en frascos de cultivo de tapón ventilado (*flask*) de la marca *Falcon*, excepto aquellos cultivos destinados a la realización de inmunofluorescencia de las células, que se siembran en placas de cultivo celular (p6, p35 o p100, también de la marca *Falcon*) por la dificultad que supone la manipulación de las laminillas cubreobjetos de vidrio en los *flasks*.

4.1. Líneas celulares utilizadas

4.1.1. Línea celular de linfoblastos inmortalizados

Las líneas celulares GM10180, GM10181 y GM10182 procedentes del *Coriell Institute* se crecieron en medio RPMI suplementado con FBS (suero fetal bovino) descomplementado al 15 %. Se comprobó que las células duplicaban su número a las 48 horas, y en algunos casos fue necesaria la adición de antibióticos al medio de cultivo como prevención frente a contaminación bacteriana. Los antibióticos utilizados fueron gentamicina, penicilina y estreptomicina a unas concentraciones finales en el medio de cultivo de 80 µg/ml, 100 UI/ml y 100 µg/ml, respectivamente.



4.1.2. Línea celular C2C12 (mioblastos murinos)

La línea celular C2C12 fue amablemente cedida por el laboratorio de la Dra. Margarita Cervera. Los mioblastos crecieron en medio DMEM suplementado con FBS descomplementado al 10 %. Para conservar el estado indiferenciado se mantienen como máximo durante 3 pases, y procurando que no sobrepasen el 70 % de confluencia. Para lograr el estado de diferenciación, se deja a las células llegar al estado de confluencia, y se sustituye el FBS por HS (suero de caballo) al 2 %. Tras esta sustitución de medio, las células tardan varios días en alcanzar el estado de diferenciación, proceso que puede visualizarse por la distribución longitudinal de las células y la formación de entrelazados entre las mismas.

4.1.3. Línea celular SH-SY5Y (neuroblastos humanos)

La línea celular SH-SY5Y fue amablemente cedida por el laboratorio del Dr. González Castaño. Los neuroblastos crecieron en medio RPMI suplementado con FBS descomplementado al 10 %.

4.2. Aislamiento del α -dístroglicano del medio de cultivo celular

Para aislar el α -DG del medio de cultivo se tomó como referencia el protocolo descrito por Singh *et al.* (Singh *et al.*, 2004) con algunas modificaciones.

Para el experimento se sembraron en 15 ml de medio 5×10^6 células GM10180, y la misma cantidad de células GM10182, en *flasks* T75. Se dejaron crecer durante 36 horas para llegar a un estado de confluencia del 80-90 %, tras lo cual se centrifugaron las células y se recogió el medio de cultivo. Como control se utilizaron células C2C12, que se crecieron a confluencia total y con medio de diferenciación durante 48 horas, tras lo cual se recogió dicho medio y se centrifugó también para eliminar posibles restos celulares. Al medio recogido se le añadió “cocktail” de antiproteasas *Complete Mini* (Roche Diagnostics) hasta una concentración final 1x, y antiproteasas a concentraciones finales similares a las descritas en el apartado 3.1. 15 ml de medio de cultivo de los tres tipos celulares a analizar se centrifugaron durante 45 minutos a 18 °C a una velocidad de



4.000 xg en columnas concentradoras de proteínas *Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units* (Millipore), tras lo cual se obtuvo un volumen de 250 μ l. 200 μ l de este concentrado de las células GM10180 y GM10182, y 100 μ l del concentrado de células C2C12, se incubaron respectivamente con 30 y 15 μ l de WGA-Agarosa *Agarose Wheat Germ Lectin* (Pharmacia Biotech) a 4 °C durante 17 horas en agitación. Se centrifugaron a 15.000 rpm 2 veces durante 15 minutos a T^a ambiente, y se lavaron los precipitados 2 veces con 100 μ l de tampón compuesto por 100 mM Tris-HCl pH= 7,4, 300 mM NaCl y 1 % Nonidet P40. Se resuspendieron los precipitados con 10 μ l de tampón de carga Laemmli 1x. Las muestras se hirvieron durante 10 minutos para romper las uniones con la WGA-agarosa y se cargó el total de la muestra en un gel de acrilamida al 7 %. Se realizó el ensayo de Western blot utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo VIA-4.

4.3. Transfección de linfoblastos con el distroglicano

4.3.1. Construcciones plasmídicas

Para la realización de estas construcciones se utilizó el plásmido pFLAG-CMV-3 (SIGMA). Este vector contiene el epítipo FLAG y la secuencia líder de la pre-protripsina (PPT LS) que actúa como péptido señal delante del sitio de clonación múltiple. El cDNA del distroglicano clonado en este vector fue tomado del que se encontraba previamente clonado en el vector pEF4/*Myc*-His versión C (Invitrogen) que contiene los epítipos c-myc y 6xHis detrás del sitio de clonación múltiple. El fragmento clonado, de 2,8 kb, incluyó el cDNA del distroglicano completo (desde el ATG) además de los epítipos c-myc y 6xHis procedentes del plásmido pEF4. El objetivo de mantener estos epítipos finales era el de tener epítipos tanto para el α -DG como para el β -DG, ya que a partir de un único cDNA se producen ambas proteínas, que posteriormente se separan mediante rotura proteolítica. De esta forma el α -DG se puede detectar mediante el epítipo FLAG y el β -DG mediante el epítipo c-myc. La señal obtenida con el anticuerpo VIA-4 es siempre sensiblemente menor que la obtenida con el anticuerpo anti- β -DG en igualdad de condiciones, y en ocasiones el VIA-4 no funciona correctamente. Además, desconocíamos el grado de glicosilación del α -DG en linfoblastos, por lo que aseguramos la detección mediante el uso de estos epítipos.



Se clonaron dos versiones del distroglicano, llamadas A y B. La llamada “construcción A” incluye toda su secuencia proteica, incluida la de su propio péptido señal, mientras que en la “construcción B” se decidió eliminar el péptido señal propio del distroglicano por si entraba en conflicto con la existencia del otro péptido señal delantero (la secuencia PPT LS del pFLAG-CMV-3). El péptido señal del distroglicano se encuentra altamente conservado (Figura 10a), por lo que consideramos que podría ser necesario para su correcta localización en la membrana. Así pues, la construcción B incorpora el DG a partir de la Ser29 (Figura 10b). Los cebadores utilizados para las distintas clonaciones se muestran en la tabla 4.

(a)

H. sapiens	MRMSVGLSLLLPLWGRTFLLLLLSVVMAQSHWPSEPSEAVRDWENQLEASM
P. troglodytes	-----
O. cuniculus	-----C-AV-----
C. familiaris	---A-----A-----G-----
M. mulatta	-----MA-QI-F-A-----D-----
M. musculus	-----DNW--H--Q-----AV--A-----
R. norvegicus	-----DNW--H--Q-----AV--A-----K-----
B. taurus	-----SAVP-----AVT-----

(b)



Figura 10. Secuencia peptídica inicial del distroglicano. (a) Se muestra en verde la secuencia correspondiente al péptido señal y el alineamiento de esta parte de la secuencia entre distintas especies. (En este y sucesivos alineamientos, los guiones en negro indican identidad de la secuencia con respecto a la del *H. sapiens*, y los guiones en rojo indican aminoácidos de los cuales carecen esas especies). (b) Secuencia que incorporan las dos construcciones realizadas del DG para su sobreexpresión en linfoblastos inmortalizados.

**Tabla 4.** Cebadores utilizados para las clonaciones de las construcciones A y B del distroglicano.

Nombre cebador	Secuencia	Orientación
Construc. A- <i>EcoRI</i> -D	5' CGGAATTCGATGAGGATGTCTGTGGG 3'	Directo
Construc. B- <i>EcoRI</i> -D	5' CGGAATTCTCATCCCCTGGCCAGT 3'	Directo
Dys- <i>BglIII</i> -TGA-R	5' TCACCATCACATTGAGTAGATCTCCG 3'	Reverso

El cebador reverso es común a las dos clonaciones. Se han subrayado las dianas correspondientes a las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *BglIII*, respectivamente. Se señala en naranja el codón de iniciación ATG y en rojo el codón de terminación TGA.

Las células fueron transfectadas mediante electroporación en un electroporador *MicroPorator* (Digital Bio Technology). Previamente a esta metodología, se probó a realizar la transfección mediante lipofección sin obtener resultados satisfactorios. Se realizaron las pruebas de electroporación con dos cantidades distintas, 4×10^5 y 6×10^5 células, creciendo en un volumen de 3 ml. Las células se centrifugaron y resuspendieron en un volumen de 100 μ l para la electroporación, que se realizó en puntas de oro. Se probaron diversos programas de electroporación, utilizando para estas pruebas el plásmido pEGFP-N1 (Clontech) que expresa la proteína verde fluorescente. Los programas de prueba elegidos fueron escogidos en función de aquellos programas optimizados para líneas celulares derivadas de linfocitos B (semejantes a las células inmortalizadas de la familia 4) y recogidos en la “*Celular database*” de Digital Bio, accesible a través de su página web: www.microporator.com.

Tabla 5. Combinaciones de pulsos y voltajes utilizados a fin de optimizar el resultado de la electroporación del plásmido pEGFP-N1 en linfoblastos inmortalizados.

Numero de pulsos	Voltaje	Tiempo
1 pulso	1.350 V	30 ms
1 pulso	1.400 V	30 ms
2 pulsos	1.100 V	30 ms
2 pulsos	900 V	30 ms



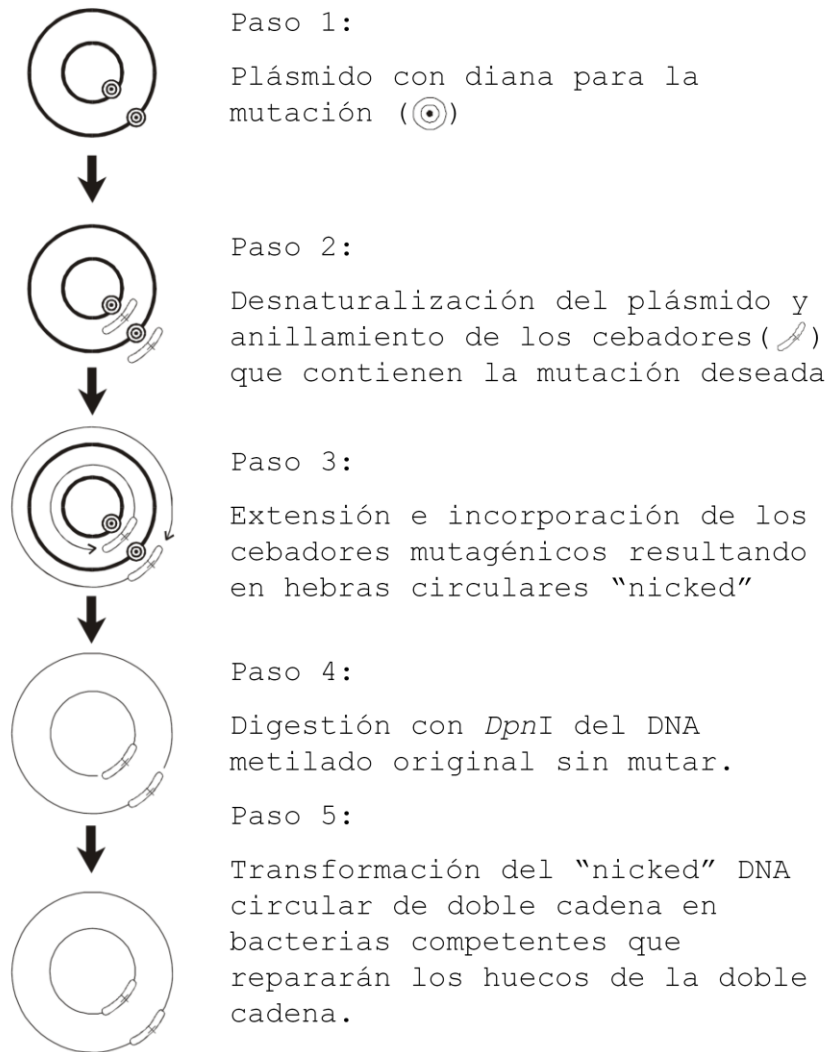
Se midió la eficiencia de transfección y la viabilidad de las células transfectadas mediante citometría, determinando que el programa más adecuado era el de 1.350 mA durante 30 ms. Y se estimó el porcentaje de transfección en un 80 %. Así, se transfectaron por duplicado células GM10180 y GM10182 con las dos construcciones del distroglicano. Se dejaron crecer las células transfectadas durante 48 horas, tras lo cual se realizó la inmunofluorescencia tal como se describe en el apartado 3.3, utilizando como anticuerpos primarios anti-FLAG detectado con Alexa-488 para el α -DG, y anti-c-myc detectado con Alexa-594 para el β -DG.

4.3.2. Transfección de otros tipos celulares

Para los restantes tipos celulares se emplearon otros métodos de transfección. Las células SH-SY5Y y C2C12 se transfectaron utilizando el método del fosfato cálcico y mediante lipofección utilizando el agente *FuGene* (Roche Diagnostics).

5. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

El sistema de la mutagénesis dirigida consiste en la reproducción de mutaciones en un gen mediante PCR. Para ello se diseñan cebadores complementarios al cDNA del gen con la mutación que se quiere generar, y se reproduce en el gen mediante amplificación por PCR. La PCR amplifica la totalidad del gen que se encuentra clonado en el plásmido además del propio plásmido, dando lugar a productos de PCR de doble cadena circulares con una rotura en cada una de las hebras al inicio de cada cebador. Estas hebras se mantienen unidas a través de los puentes de hidrógeno intercatenarios. Los productos generados se digieren con la endonucleasa *DpnI*, enzima sensible a metilación Dam que reconoce únicamente dianas que se encuentran metiladas. El DNA molde, que no se encuentra mutado y que procede de la extracción de un cultivo de *E. coli* DH5 α *dam*⁺, es digerido por *DpnI*. De esta forma no queda ningún producto que incorpore el plásmido molde sin mutar. Tras la digestión se transforman bacterias competentes *E. coli* DH5 α para obtener abundante cantidad de plásmido mutagenizado (Figura 11).



LEYENDA	
	DNA plasmídico parental
	Cebador mutagénico
	DNA plasmídico mutado

Figura11. Procedimiento de la mutagénesis dirigida. Se muestra el proceso de forma detallada en cinco pasos. Al final se obtiene DNA circular de doble cadena en el cual se ha insertado la mutación deseada.

5.1. Elección de las mutaciones y diseño de cebadores

Las mutaciones elegidas para realizar la experimentación fueron aquellas que se encontraban descritas hasta la fecha para todos los pacientes de WWS, incluyendo las mutaciones detectadas en las familias 1 y 2, detalladas posteriormente en el apartado de



“Resultados”. Los cebadores utilizados fueron diseñados con ayuda de la aplicación informática de Stratagene indicada en la URL: <http://labtools.stratagene.com/QC>, sintetizados por la casa comercial Isogen y purificados por PSF (purificación libre de sales). Para cada reacción de PCR de mutagénesis fueron necesarios dos cebadores con la misma secuencia, pero complementarios (*sense* y *antisense*) para que cebasen en ambas cadenas y así amplificasen las dos hebras del vector (ver tabla 6).

Tabla 6. Cebadores empleados en la mutagénesis dirigida del gen *POMT1*.

Mutación cDNA	Proteína	Secuencia del cebador
226G>A	Gly76Arg	5' -CATGGTGTCTGGCCTTG A GAGGTTATTTAGGAGGA-3'
		5' -TCCTCCTAAATAACCTC T CAAGGCCAGCACCATG-3'
586G>A	Ala196Thr	5' -CACTGACAGGGGTC A CTTGTTCTGTGCAG-3'
		5' -CTGCACAGGAACAAG T GACCCCTGTCAGTG-3'
841C>T	Gln281X	5' -TGTCCAGTGCCTTC T AGGCCAGCTTAGAGG-3'
		5' -CCTCTAAGCTGGCCT A GAAGGCACTGGACA-3'
1087C>T	Tyr363X	5' -CCCAGGAGGCAC T AGCTGGTGGTGAG-3'
		5' -CTCACCACCAGCT A GTGCCTCCTGGG-3'
1217T>A	Val406Asp	5' -CCCATTCACAGGAGG A CTCCTGCTACATTGAC-3'
		5' -GTCAATGTAGCAGGAG T CCTCCTGTGAATGGG-3'
1439_1441del CCT	Leu399del	5' -GATGTTGCAGCCCC G AGCCCCATTAC-3'
		5' -GTGAATGGGGGCTCGGGGCTGCAACATC-3'
1545C>G	Ser515Arg	5' -CAGGTGGACGTCAG G AGGAACCTCAGCTTC-3'
		5' -GAAGCTGAGGTTCT C CTGACGTCCACCTG-3'
2045insG	Val681fs	5' -CCCTGGTGGTGG G CCTGGTACTCCTCC-3'
		5'-GGAGGAGTACCAGGCCACCACCAGGG-3'
2098G>A	Gly700Arg	5' -GCCCCTCACCTAC A GGGACAAGTCACTCT-3'
		5' -AGAGTGACTTGTCCC T GTAGGTGAGTGGGC-3'
2102insG	Gly700fs	5' -CTCACCTACGGGG G ACAAGTCACTCTCGC-3'
		5'-GCGAGAGTGACTTGTCCCCGTAGGTGAG-3'
POMT1- <i>Xba</i> IR		5'-GCTCTAGAGTGGCGAGAGTGA C TGTCC-3'

Se detalla en la primera columna la mutación generada para el cDNA, en la segunda columna el cambio al que daría lugar en la proteína y en la tercera columna las secuencias de los cebadores. Para cada mutación se muestra el cebador “sense” e inmediatamente debajo el “antisense”. El uso del cebador POMT1-*Xba*IR se explicará en el siguiente apartado.



5.2. Mutagénesis mediante PCR

El proceso de la mutagénesis se realizó en el cDNA de *POMT1* clonado en el plásmido pBluescript II KS por su tamaño de tan sólo 2,9 kb. Las mutaciones se reprodujeron en este cDNA mediante PCR a partir de 50 ng del plásmido en un volumen final de 50 µl, y según la siguiente mezcla de reacción: 2 mM de MgCl₂, 125 ng de cada cebador, 2 mM de dNTPs y 2.5 U de la enzima *Pfu Ultra High-Fidelity DNA polymerase* (Stratagene). El programa de PCR fue el siguiente:

Paso 1	Desnaturalización	95 °C		5 min
	Paso 2 (desnaturalización)	95 °C	30 seg	12/16 ciclos
	Paso 3 (anillamiento)	55 °C	1 min	
	Paso 4 (elongación)	68 °C	5 min	
Paso 5	Elongación final	68 °C		7 min

El número de ciclos dependió del tipo de mutación a reproducir: 12 para un cambio simple de nucleótido y 16 para una inserción o deleción.

Tras la digestión con *DpnI* y la transformación en *E. coli* se obtuvo cantidad suficiente de plásmido mutagenizado. El plásmido pBluescript no es de expresión en células eucariotas, por lo que había que introducir el cDNA mutagenizado en un plásmido que sí lo fuese. Se escogió el plásmido pEF4/*Myc*-His versión C (Invitrogen). Este plásmido contiene los epítomos c-myc y 6xHis detrás del sitio de clonación múltiple para que se traduzcan en pauta con la proteína que se introduce en el plásmido. Las mutaciones 2045insG y 2102insG alteran la pauta de lectura y generan un codón de terminación prematuro. Por lo tanto, fue necesario diseñar el cebador Pomt1G-*Xba*IR (mostrado al final de la tabla 6), para amplificar la proteína mutagenizada en el pBS y asegurar la traducción en pauta con los epítomos del plásmido pEF4.



Una vez estuvieron todas las mutaciones diseñadas en el plásmido pEF4, se comprobó mediante secuenciación que en el cDNA insertado no se había producido ninguna mutación adicional a la generada mediante mutagénesis. De todos los plásmidos mutagenizados se realizaron maxipreparaciones con el kit *PureYield Maxiprep system* (Promega) para obtenerlos en grandes cantidades y poder transfectarlos en células.

5.3. Transfección de los plásmidos con el gen *POMT1* mutagenizado en células

Se transfectaron células SH-SY5Y y células C2C12 con los cDNAs de *POMT1* portadores de las mutaciones citadas mediante los métodos descritos en el apartado 4.3.3. Las células transfectadas se dejaron crecer durante 48 horas, tras lo cual se realizaron inmunofluorescencias y ensayos de “laminin overlay” de las células transfectadas con cada mutación.

6. PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS

Los productos químicos utilizados en el presente trabajo, incluyendo reactivos, soluciones y tampones, fueron de grado analítico o de grado apto para biología molecular. La composición de los reactivos empleados en los distintos experimentos se especifica en la descripción de los métodos o, en su defecto, en la bibliografía correspondiente.

Resultados



1. BÚSQUEDA DE LOS GENES RESPONSABLES DEL WWS

1.1. Gen de la *proteína O-manosiltransferasa 1: POMT1*. El gen *POMT1* como causante del síndrome de Walker-Warburg

El locus rotated abdomen (*rt*) fue descrito por primera vez en 1923 (Bridges and Morgan, 1923) como una mutación recesiva que causaba rotación helicoidal del abdomen de *Drosophila*. Mutaciones en este locus dan lugar a daños musculares durante el desarrollo embrionario y la rotación helicoidal del abdomen en los individuos adultos. Posteriormente, la caracterización molecular del gen *rt* por Martín-Blanco y García-Bellido (Martin-Blanco and Garcia-Bellido, 1996) permitió postular que este gen codificaba una proteína *O*-manosiltransferasa, homóloga a las PMTs de levaduras. El descubrimiento de esta proteína supuso la primera evidencia de la posible existencia de este tipo de actividad enzimática en eucariotas superiores, y por tanto, la de proteínas glicosiladas con residuos de manosa incorporados a Ser/Thr, que hasta la fecha no habían sido identificadas.

A la vista de estos resultados el grupo de investigación del Dr. Cruces decidió iniciar la caracterización del gen ortólogo humano de *rt*, por la relevancia de atestiguar por primera vez la *O*-manosilación en mamíferos, y por la posible implicación de este gen en alguna patología humana, concretamente en distrofias musculares congénitas (CMDs) por similitud con el mutante de *Drosophila*. Finalmente se encontró y caracterizó el gen ortólogo humano que se denominó *POMT1*, el cual se posicionó en el cromosoma 9q43.1 (Jurado *et al.*, 1999). Nuestro grupo fue el primero en postular que defectos en la *O*-glicosilación de proteínas podrían estar implicados en distrofias musculares congénitas. A fin de buscar la distrofia muscular que podría estar causada por mutaciones en este gen, se comprobó el posicionamiento de diferentes CMDs en esta región humana y en la equivalente genómica del ratón en el cromosoma 2B. Mientras que en humanos no había posicionada ninguna CMD en 9q34.1, en el ratón estaba posicionada en 2B la distrofia muscular con miositis “mdm” (Muller-Seitz *et al.*, 1993). Sin embargo, una vez enviado el DNA de este mutante desde el “Jackson Laboratory” (Bar Harbor, Maine), se comprobó que no tenía ninguna mutación en el gen *Pomt1* murino. Posteriormente se demostró que



el gen causante de esta patología en el ratón era el gen de la proteína muscular titina (Garvey *et al.*, 2002), que se encontraba posicionado en esta región.

En 1997 se demostró por primera vez la existencia de una proteína de mamíferos que contenía residuos de manosa unidos mediante enlaces *O*-glicosídicos a Ser/ Thr. Esta proteína, el α -dístroglicano (α -DG), fue identificada en nervio periférico bovino (Chiba *et al.*, 1997), y poco después también en músculo esquelético de conejo (Sasaki *et al.*, 1998), como ya se cita en “Introducción”. Se postuló que ésta podría ser una de las posibles dianas de *O*-manosilación por parte de POMT1. Además, se conocía ya la participación del α -DG en el complejo glicoproteico de unión a distrofina (DGC), presente tanto en membranas musculares como en membranas de células nerviosas. Debido a este hecho, se enfocó la búsqueda de la patología relacionada con POMT1 siguiendo un patrón de CMD asociada a alteraciones del sistema nervioso. Se valoraron muchas patologías como candidatas, focalizándose la búsqueda en aquellas CMDs con participación cerebral como la FCMD, la enfermedad MEB y el WWS, debido a que el α -DG es también un componente esencial en células neuronales.

Posteriormente, en base a análisis preliminares de ligamiento genético realizado en pacientes de las enfermedades anteriormente citadas, se tomó como candidata más probable el WWS, por haberse posicionado esta enfermedad con una cierta probabilidad en 9q34, donde se encuentra posicionado el gen *POMT1*. De esta manera comenzó la búsqueda de mutaciones en el gen *POMT1* en pacientes de WWS. Finalmente se encontraron mutaciones en este gen en 6 pacientes de un total de 30 individuos diagnosticados de WWS, trabajo que fue publicado en colaboración con el grupo del Dr. Brunner, como ya se ha citado en “Introducción” (Beltran-Valero de Bernabe *et al.*, 2002).

Los resultados de la secuenciación del gen *POMT1* en nuestro laboratorio han dado resultados positivos en un porcentaje de pacientes elevado, como se verá en el apartado 2.1.



1.2. Genes *DNAJB6*, *DNAJB11* y *CRYAB*. Los genes *DNAJB6*, *DNAJB11* y *CRYAB* podrían ser responsables de ciertos casos de WWS aún por diagnosticar molecularmente

El sistema de doble híbrido en levadura fue una metodología empleada con el fin de identificar en un sistema *in vivo* alguna proteína que interaccionase con la proteína POMT1. Mediante esta metodología, y utilizando como “cebos” de interacción los “loops” 1 y 5 de POMT1 y también de POMT2, se identificaron en nuestro laboratorio una serie de proteínas con las que se producía interacción. Estas proteínas resultaron ser: FAM48A (proteína de interacción con p38), CRYAB (α -cristalina B), COX11 (citocromo oxidasa 11, chaperona de cobre), DNAJB6 (proteína de choque térmico homóloga a DNAJ bacteriana, subfamilia B, miembro 6), DNAJB11 (proteína de choque térmico homóloga a DNAJ bacteriana, subfamilia B, miembro 11) y HNAC1 (ceramidasa mitocondrial) (resultados sin publicar). Puesto que en la actualidad sólo un bajo porcentaje de pacientes de WWS tiene caracterizado el gen causante de la enfermedad, se planteó la hipótesis de que mutaciones en alguno de estos genes detectados por el sistema de doble híbrido pudiese causar también esta patología. Como se ha indicado previamente, muchas de estas proteínas son chaperonas, por lo que se pensó que podrían ser proteínas coadyuvadoras de POMT1 o POMT2, cuya falta o disfunción podría causar un fenotipo similar al causado por las mismas proteínas a las que ayudasen. En apoyo a esta hipótesis estaba el hecho de que mutaciones en el gen *CRYAB* (chaperona de la desmina) dan lugar al mismo tipo de miopatía miofibrilar (OMIM 601419) que mutaciones en el gen de la *desmina*, que por un incorrecto plegamiento de ésta se acumula en el músculo (Vicart *et al.*, 1998). De entre estos genes se eligieron *DNAJB6*, *DNAJB11* y *CRYAB* para comenzar el análisis molecular por su calidad de chaperonas.

Los resultados de la secuenciación de los genes *DNAJB6*, *DNAJB11* y *CRYAB* han sido negativos para todos los pacientes analizados (Familias 1, 2, 4 y paciente 3.1).



1.3. Gen de la *fukutina*. El gen de la *fukutina* ha resultado ser un gen con prevalencia en el WWS

Como ya se ha comentado en “Introducción”, el gen de la *fukutina* se describió por primera vez como causante de la FCMD debido al efecto fundador en la población japonesa de la inserción de un retrotransposón tipo SVA en la zona 3’ no traducida del gen. En los enfermos de FCMD, el retrotransposón podía encontrarse en homocigosis, o en heterocigosis con mutaciones puntuales en la región codificante del gen. Cuando esto último sucedía, los pacientes presentaban un cuadro clínico más grave a todos los niveles (muscular, cerebral y ocular), por lo que empezaron a llamarse enfermos de FCMD con fenotipo tipo-WWS. Posteriormente, como ya se cita en “Introducción”, se describieron dos pacientes con diagnóstico clínico de WWS y mutaciones puntuales en el gen de la *fukutina* en ambos alelos (de Bernabe *et al.*, 2003; Silan *et al.*, 2003), momento en el que el gen de la *fukutina* pasó a formar parte de la cohorte de genes que dan lugar al WWS.

2. ANÁLISIS MUTACIONAL DE LOS GENES RESPONSABLES DEL WWS

El rastreo mutacional de las familias ha comenzado en todos los casos por el gen *POMT1*, ya que éste fue el primer gen en el cual se encontraron mutaciones en enfermos de WWS y en la actualidad sigue siendo el responsable del mayor porcentaje de casos del citado síndrome.

2.1. Análisis mutacional del gen *POMT1*. El gen *POMT1* continua siendo la causa principal del WWS

Se han encontrado mutaciones en la secuencia codificante del gen *POMT1* en las familias 1 y 2, y en los pacientes 5.1 y 6.1. Anteriormente, en la Figura 7 (sección 1 de “Materiales y Métodos”) se muestran los árboles genealógicos de todas las familias citadas en este trabajo de tesis doctoral. Sin embargo, para hacer más comprensibles los resultados del análisis molecular detallado en los siguientes apartados, se volverán a mostrar los árboles genealógicos junto al nombre de cada familia (Figura 12 para las familias 1 y 2 y Figura 15 para los pacientes 5.1 y 6.1).



2.1.1. Familia 1

La mutación encontrada en esta familia es una transición c.2098G>A que predice la sustitución p.Gly700Arg en el exón 20 de *POMT1*. Esta mutación se ha detectado en heterocigosis en la madre del enfermo (sujeto 1.2, Figura 12a) y la sustitución originada genera una diana de restricción *BmfI*. Se ha comprobado por digestión en 103 individuos no relacionados (206 cromosomas) que no se trata de un polimorfismo (ver posición de la mutación en la Figura 3, página 42). La glicina mutada se encuentra conservada en todas las especies analizadas, tanto en *POMT1* como en *POMT2* (Figura 12b). Mediante digestión y posterior secuenciación se comprueba que el hermano sano 1.4 no es portador de la mutación (Figura 12a).

La secuencia codificante completa de *POMT1* fue analizada en este individuo, ya que al no ser portador de esta mutación de la madre, podría ser portador de la mutación del padre, del cual no tenemos material genético a analizar. No se encontró alteración alguna en el sujeto 1.4. Este paciente presentaba un alto porcentaje de homocigosidad en SNPs (siendo la madre 1.2 heterocigota para muchos de ellos), por lo que fue analizado mediante Southern blot. Sin embargo, como se detalla más adelante en el apartado 2.1.2.3, el ensayo del Southern blot no mostró ningún fragmento de restricción de tamaño distinto al esperado en este paciente (ver más adelante en la Figura 14, apartado 2.1.2.3).

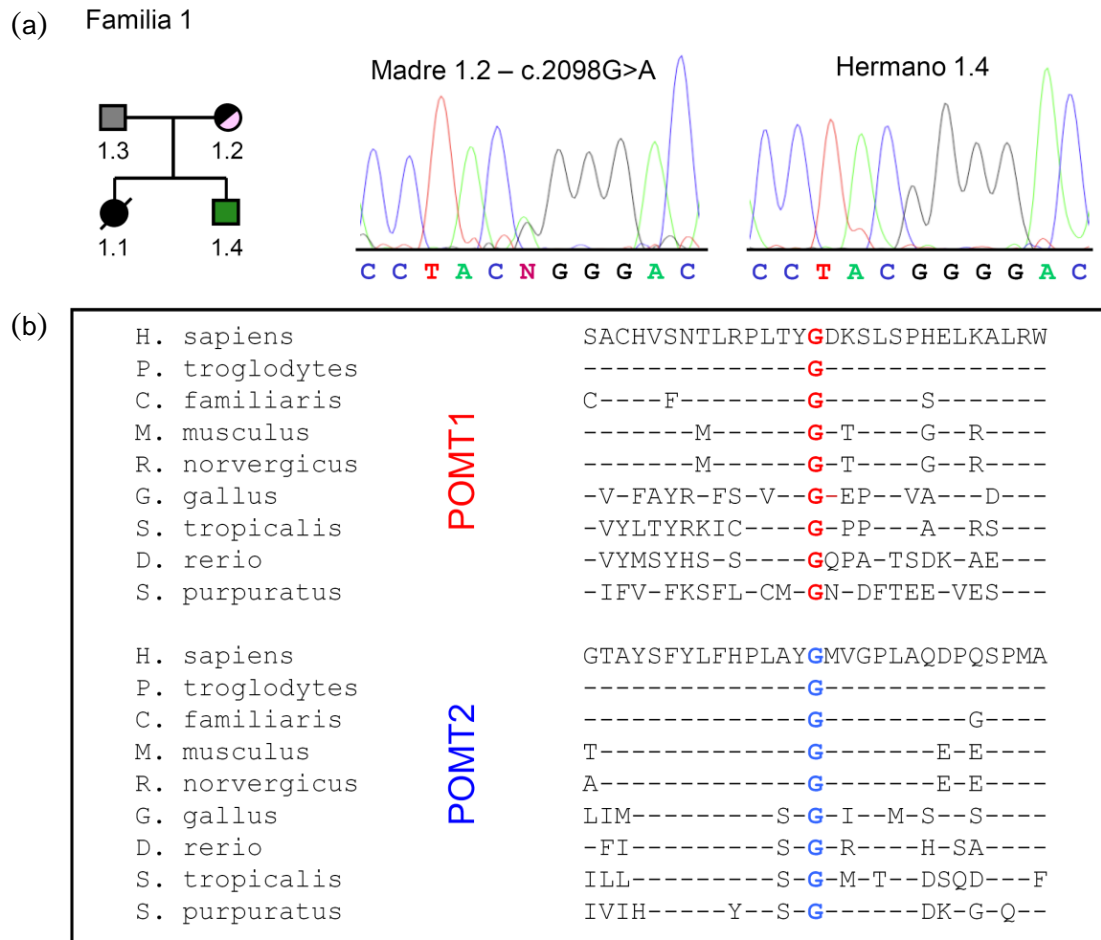


Figura 12. Mutaciones en el gen *POMT1* en la familia 1. (a) La madre 1.2 es portadora de la transición c.2098G>A que provoca el cambio p.G700R. El hermano sano 1.4 no es portador de esta mutación. (b) Esta glicina se encuentra conservada evolutivamente en todas las POMT1 y POMT2 analizadas hasta la fecha, mostrándose sólo algunos de los organismos más significativos.



2.1.2. Familia 2

El análisis genético en esta familia detectó una mutación en el padre del individuo afectado. La mutación consiste en una transición c.586G>A que predice la sustitución p.Ala196Thr en el exón 7 de *POMT1* (Figura 13a). Esta sustitución genera una diana de restricción *NmuCI*, mediante la cual se comprueba en 145 individuos no relacionados (290 cromosomas) que no es un polimorfismo. La mutación es detectada en heterocigosis en el padre 2.3 y se comprueba mediante secuenciación directa que ambos hijos sanos 2.4 y 2.5 son portadores de la mutación del padre (datos no mostrados).

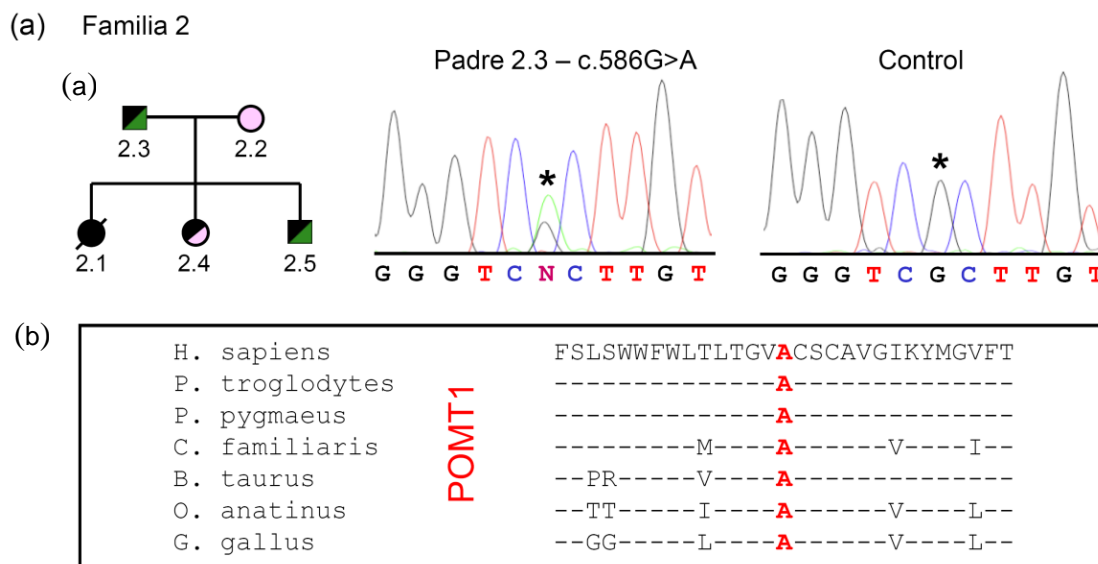


Figura 13. Mutaciones en el gen *POMT1* en la familia 2. (a) El padre 2.3 es portador de la transición c.586G>A que provoca el cambio p.A196T. Ambos hijos sanos son portadores de esta mutación. (b) Esta alanina se encuentra conservada en vertebrados.

Esta alanina se encuentra situada en uno de los motivos en alfa-hélice predichos para *POMT1*, en el lado citoplásmico de la proteína (ver Figura 3, página 41). Esta alanina está conservada en primates, algunos mamíferos y algunas aves, aunque no en roedores (Figura 13b). La madre 2.2 no es portadora de esta mutación y tampoco se detecta ninguna otra mutación en el gen *POMT1* que pudiese haber heredado el individuo enfermo conjuntamente con la del padre y que explicase el fenotipo WWS.



2.1.2.1. Rastreo mutacional del gen *POMT1* en la madre 2.2

Puesto que en el momento en el que se estaba llevando a cabo el rastreo mutacional de la familia 2 la única causa conocida del WWS era el gen *POMT1* y puesto que en el padre 2.3 se había encontrado mutación en este gen, se procedió a buscar exhaustivamente una mutación en la madre 2.2. La única opción valorada como alternativa era la disomía uniparental, pero esta opción no era posible comprobarla ya que carecíamos de material genético del paciente 2.1. Se barajaban varias opciones por las cuales este individuo fuese portador de una mutación en el gen *POMT1* y no se hubiese detectado por secuenciación: a) que la mutación se encontrase en una zona intrónica no secuenciada, afectando a una posible secuencia reguladora del gen necesaria para su correcta transcripción; b) que la mutación afectase a la zona promotora más allá de la zona secuenciada, impidiendo de esta manera la correcta unión de factores de transcripción; o c) que la madre 2.2 hubiese sufrido una delección de todo o parte del gen en uno de los alelos. La hipótesis de la delección cobró relevancia al observar que la madre 2.2 presentaba homocigosidad en todos los SNPs que se iban encontrando en las secuencias, algunos de los cuales estaban aún sin describir. Así pues, se realizaron una serie de estudios para comprobar el grado de homocigosidad del sujeto 2.2 para el gen *POMT1*.

2.1.2.2. Estudio de SNPs

El estudio de SNPs fue el primer indicativo de la elevada homocigosidad del gen *POMT1* en el sujeto 2.2. En la tabla 7 se muestran los números de referencia de los SNPs descritos que fueron secuenciados, los nucleótidos alternativos que pueden encontrarse en ellos y el grado de heterocigosidad que presentan. Según estos datos el individuo 2.2 tendría un grado de homocigosidad del gen del 0,79.

Un total de 54 SNPs fueron secuenciados, 33 de ellos descritos entonces en el NCBI (detallados en la tabla 7), siendo el resto variaciones con respecto de la secuencia depositada en el GenBank. Todos ellos se hallaron en estado de homocigosis. Además de estos 33 SNPs descritos en la base de datos del NCBI, se comprobó que la madre 2.2 era homocigota para los 21 polimorfismos adicionales no descritos. De hecho, no se observa ningún pico doble en ninguna de las secuencias analizadas.

**Tabla 7.** SNPs de POMT1 analizados en el individuo 2.2.

Referencia	Posición	Nucleótidos	2.2	Heterocigosidad
rs 13292606	Intrón 6	T/G	T	N.D.
rs 4997217	Exón 8'	T/G	T	N.D.
rs4995933	Exón 8'	A/G	A	N.D.
rs 3887873	Exón 8'	C/T	C	0.305
rs 2296949	Exón 8'	A/G	G	0.211
rs 5900942	Intrón 8	T/N	T	N.D.
rs 2018621	Intrón 8	A/G	G	0.208
rs 4740163	Intrón 9	T/G	G	0.005
rs 4740164	Exón 10	A/G	G	0.100
rs 3739492	Intrón 10	A/G	A	0.207
rs 3739493	Intrón 10	T/C	C	0.211
rs 3739494	Exón 11	C/T	C	0.226
rs 12379992	Intrón 12	G/A	G	N.D.
rs 17147966	Intrón 13	G/A	G	0.290
rs 1547768	Intrón 14	G/A	G	0.210
rs 749590	Intrón 15	G/A	G	N.D.
rs 749591	Intrón 15	G/A	G	N.D.
rs 2010635	Intrón 15	G/A	G	0.202
rs 2277152	Intrón 17	C/G	G	0.263
rs 2277153	Intrón 17	C/A	A	0.211
rs 4740258	Intrón 17	G/A	G	N.D.
rs 7849433	Intrón 18	C/G	G	0.202
rs 7870715	Intrón 18	C/T	C	0.166
rs 12115566	Exón 19	C/T	C	0.025
rs 4740165	Intrón 19	C/T	T	0.250
rs 3739495	Exón 20	C/T	C	0.498
rs 3824395	Exón 20	C/T	C	0.215
rs 4740259	Exón 20	G/A	G	0.043
rs 7857419	Exón 20	C/T	T	0.242
rs 10257	Exón 20	G/A	G	0.196
rs 11005	Exón 20	C/T	C	0.396
rs 1052561	Exón 20	C/T	C	N.D.
rs3183977	Exón 20	T/G	T	N.D.

Para cada uno de los SNPs se detalla el número de referencia, su localización según intrones y exones, los posibles nucleótidos, el nucleótido hallado en el individuo 2.2 y el grado de heterocigosidad descrito. Se observa que el individuo 2.2 es homocigoto para todos los SNPs analizados.

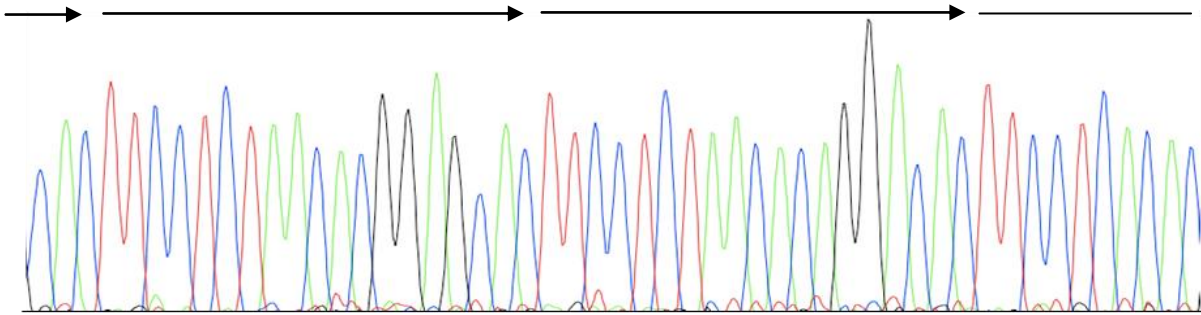
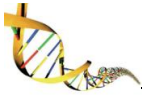


2.1.2.3. Estudio de otros polimorfismos intragénicos del gen *POMT1*

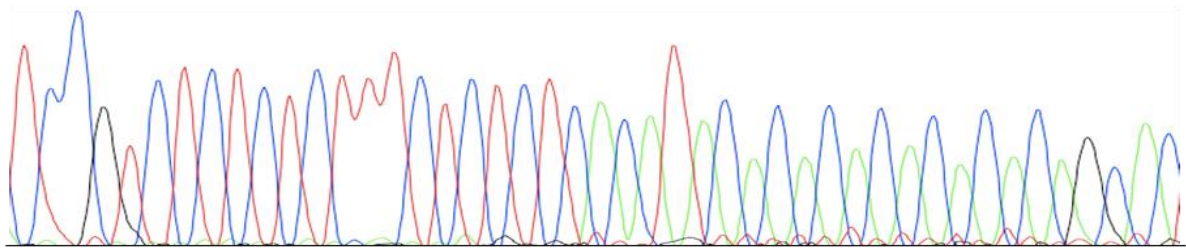
El gen *POMT1* presenta otras tres zonas polimórficas intragénicas que fueron estudiadas en la madre 2.2: el microsatélite D9S64 que se encuentra en el intrón 2, cuyo índice de heterocigosidad es 0.82, el polimorfismo tipo VNTR que se encuentra en el intrón 13 y cuyo índice de heterocigosidad es de 0.58, y una zona de repeticiones no descrita en el intrón 17 del gen consistente en repeticiones “CT” y “CA”. La madre 2.2 resultó ser homocigota para el polimorfismo tipo VNTR y para la zona de repeticiones del intrón 17 (Figura 14a y 14b). Sin embargo, resultó ser heterocigota para el microsatélite D9S64, lo cual indica que en el punto concreto del intrón 2 del gen *POMT1* coexisten los dos alelos (Figura 14c).

Además de estas zonas polimórficas de *POMT1*, se analizó un microsatélite existente en el gen inmediatamente anterior a *POMT1*, el gen *KIAA0515*, que en nuestro laboratorio previamente habíamos denominado gen *UHG62* (U62 Host gene), por codificar dos genes snoRNA U62 en dos de sus intrones. Este gen se encuentra aún sin caracterizar de forma correcta en algunos navegadores del genoma humano. En el intrón 2 de este gen se encuentra un microsatélite no descrito consistente en repeticiones de tripletes “GAT” y de dupletes “GT”. La madre 2.2 resultó ser heterocigota para este polimorfismo (Figura 14d), lo cual apoyaba la hipótesis de que hubiese ocurrido una deleción de parte del gen *POMT1* a partir del intrón 2 en adelante, ya que era a partir de este punto donde se observaba el alto grado de homocigosidad. Otra posibilidad era que hubiese ocurrido una microdeleción en la región promotora/reguladora del gen.

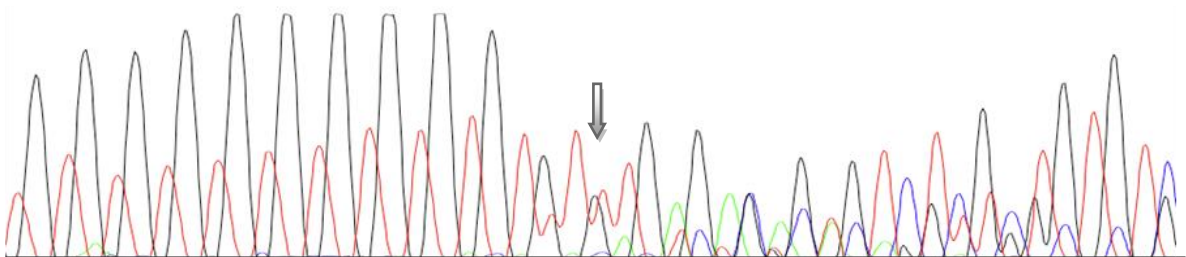
A la luz de estos resultados, se planteó un ensayo de Southern blot, utilizando como sonda el cDNA del gen *POMT1*, como la mejor forma de ver esta posible deleción.



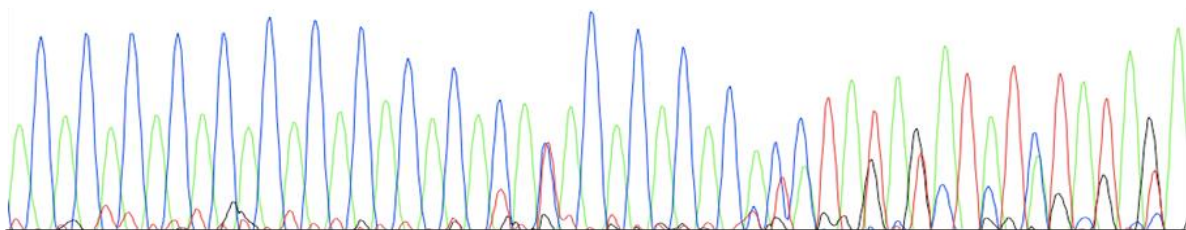
(a) Fragmento del polimorfismo tipo VNTR



(b) Zona de repeticiones del intrón 17



(c) Microsatélite D9S64



(d) Microsatélite KIAA0515

Figura 14. Productos de la amplificación mediante PCR de polimorfismos relacionados con el gen *POMT1* en la madre 2.2. (a) Parte del cromatograma del producto de la amplificación del polimorfismo tipo VNTR, para el cual la madre 2.2 resulta ser homocigota. Se marcan mediante flechas algunas de las secuencias que se repiten. (b) Fragmento del intrón 17 del gen *POMT1* en el cual se observa una zona de repeticiones CT-CA que no resulta ser polimórfica. (c) Microsatélite D9S64. Se observa cómo a partir de la zona marcada con la flecha la secuencia es doble, indicando la presencia de dos alelos en este punto del gen. (d) Cromatograma del producto de la amplificación del microsatélite situado en el intrón 2 del gen *KIAA0515*, inmediatamente anterior al gen *POMT1*. En esta parte del genoma la madre 2.2 es heterocigota.



2.1.2.3. Ensayo de Southern blot

Se realizaron dos ensayos de Southern blot con el fin de localizar una posible alteración en el gen *POMT1* en la madre 2.2 que no fuese detectable mediante secuenciación. Como se detalla en el apartado 2.8 de “Materiales y Métodos”, el primer ensayo fue realizado tomando como sonda el cDNA de *POMT1*, abarcando desde el ATG iniciador (localizado en el exón 2) hasta el codón de terminación TAG, mientras que el segundo ensayo se realizó utilizando como sonda el cDNA completo de *POMT1*, desde el nucleótido +1 (exón 1) hasta el nucleótido 3.126 final de la zona 3’ no traducida. El segundo ensayo se realizó con el objetivo de abarcar aquellas zonas del gen no representadas en el primer ensayo, las zonas 5’ y 3’ no traducidas que, en caso de estar delecionadas, podrían afectar a la correcta expresión del gen. Ambos ensayos mostraron fragmentos de restricción coincidentes con los esperados de la digestión del DNA con las enzimas seleccionadas, tanto en la madre 2.2 como en los hijos 2.4 y 2.5. El DNA del individuo 2.3 no sufrió la digestión de manera correcta en ninguno de los casos, por lo cual los datos derivados del ensayo en este individuo no son interpretables y por lo tanto no se muestran.

En la Figura 15a se muestran los fragmentos detectados como resultado del ensayo 1 en los individuos 2.2, 2.4 y 2.5. Se observa que los fragmentos coinciden con los del individuo control. Asimismo, en la Figura 15b se muestran los resultados derivados del ensayo 2. En este último ensayo se testaron además otros pacientes de WWS para descartar alteraciones no detectadas por secuenciación, como los tres miembros de la familia 7 y el individuo 1.4. Tampoco en este segundo ensayo se descubre alteración alguna en las bandas detectadas, que son del tamaño esperado y coincidentes con las obtenidas en los controles, con la excepción de los individuos 7.1 y 7.2. En los carriles correspondientes al DNA de los individuos 7.1 y 7.2 digeridos con *NcoI*+*EcoT22I*, se observa una banda adicional de 4 kb. Esta banda es resultado de la generación de una diana de restricción adicional para *NcoI* presente en estos dos individuos como consecuencia de la existencia de un SNP. Por secuenciación se ha comprobado que la madre 7.2 es portadora de este polimorfismo en homocigosis, mientras que el paciente 7.1 es portador en heterocigosis (datos no mostrados). En el carril correspondiente al



individuo 2.4 digerido con *NcoI*+*EcoT22I* no se observan bandas; atribuimos este hecho a una digestión parcial del DNA.

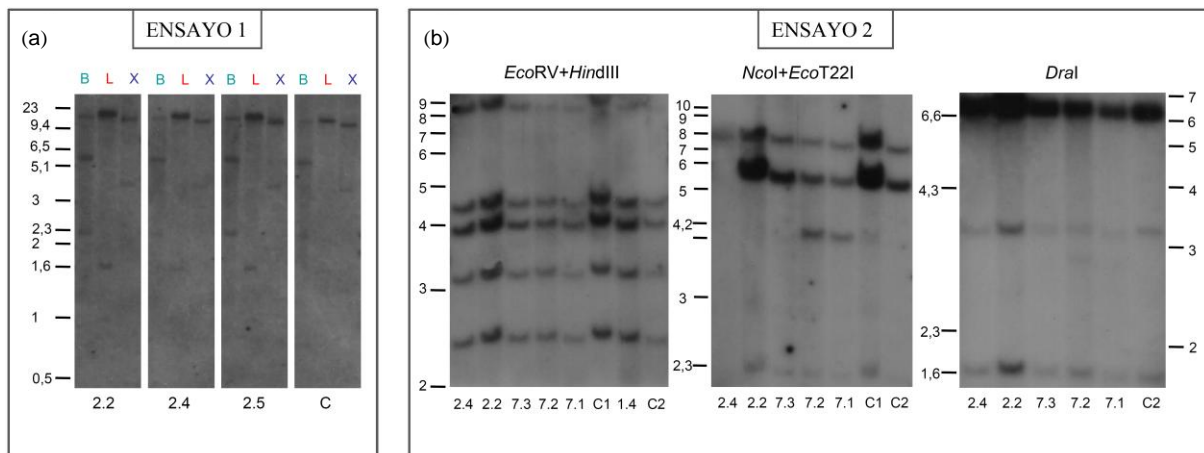


Figura 15. Southern blot de los miembros de la familia 2 (a, ensayo 1) y de la familia 2, 7 e individuo 1.4 (b, ensayo 2). (a) En los tres miembros representados de la familia 2 se observan los mismos fragmentos de restricción generados por la enzimas *Bfr*BI (B), *Bsp*LU11I (L) y *Xba*I (X) que en el individuo control. Esto descarta alteraciones génicas que abarquen la zona codificante del gen *POMT1* en cualquiera de los miembros de esta familia. (b) Lo mismo ocurre en el ensayo 2, donde se observan los mismos fragmentos de restricción en todos los individuos, a excepción de los individuos 7.2 y 7.1. En ellos se observa una banda adicional de 4 Kb en el DNA digerido con *NcoI*+*EcoT22I*, debido a un polimorfismo. El individuo 7.1 es portador de este polimorfismo en heterocigosis, que ha heredado de la madre 7.2, la cual lo porta en homocigosis. Para el resto de los fragmentos de restricción generados por digestión con las enzimas *Dra*I, *EcoT22I*+*NcoI* y *EcoRV*+*HindIII*, todos los individuos muestran patrones similares a los de los individuos control C1 y C2.

2.1.2.4. Análisis mediante MLPA (Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación)

Se analizó el DNA genómico de todos los miembros de la familia 2 y el del individuo 1.4 mediante esta técnica. Como ya se indica en “Materiales y Métodos”, el kit utilizado (*SALSA-MLPA kit p061 Lissencephaly*) incluye una colección de sondas que abarca otros genes relacionados con la lisencefalia, además del gen *POMT1*. Estos genes son *LIS1*, *DCX*, *POMGnT1* y *FLNA*. Los picos observados en los gráficos resultantes de las amplificaciones no revelaron ninguna alteración en ninguno de los sujetos analizados con respecto a los controles (datos no mostrados), por lo que se descarta la existencia de una posible delección en alguno de estos cinco genes mediante esta técnica.



2.1.3. Pacientes 5.1 y 6.1

El análisis mutacional de estos dos pacientes se va a describir en conjunto, ya que en ambos el resultado del análisis mutacional ha sido el mismo. Se han encontrado dos alteraciones distintas en el gen *POMT1*, y además, ambas mutaciones se encuentran en estado de homocigosis en ambos pacientes. La primera mutación encontrada fue una transversión c.1724C>G que predice la sustitución p.Ser515Arg en el exón 16 del gen *POMT1* (Figura 16a). Esta mutación ya había sido descrita en un paciente de WWS en estado de heterocigosis, sin que se encontrase una segunda mutación (Currier *et al.*, 2005). La serina 515 se encuentra conservada en mamíferos (Figura 16b). La segunda mutación encontrada es una transversion g.3541G>T, y se produce en la zona de unión exón-intrón, al inicio del intrón 4 (Figura 16c). Esta sustitución genera una diana de restricción *BveI*. Se ha comprobado mediante digestión en 101 individuos no relacionados (202 cromosomas) que no se trata de un polimorfismo.

De las dos mutaciones encontradas en estos pacientes se esperaba que la más grave fuese la detectada en la zona de unión exón-intrón, ya que por su localización sería razonable pensar que pudiese afectar al correcto procesamiento del mRNA. Para comprobar dicha hipótesis se diseñaron una serie de amplificaciones que, mediante discriminación por tamaño, nos dirían qué tipo de procesamiento sufre el mRNA de *POMT1* en estos pacientes.

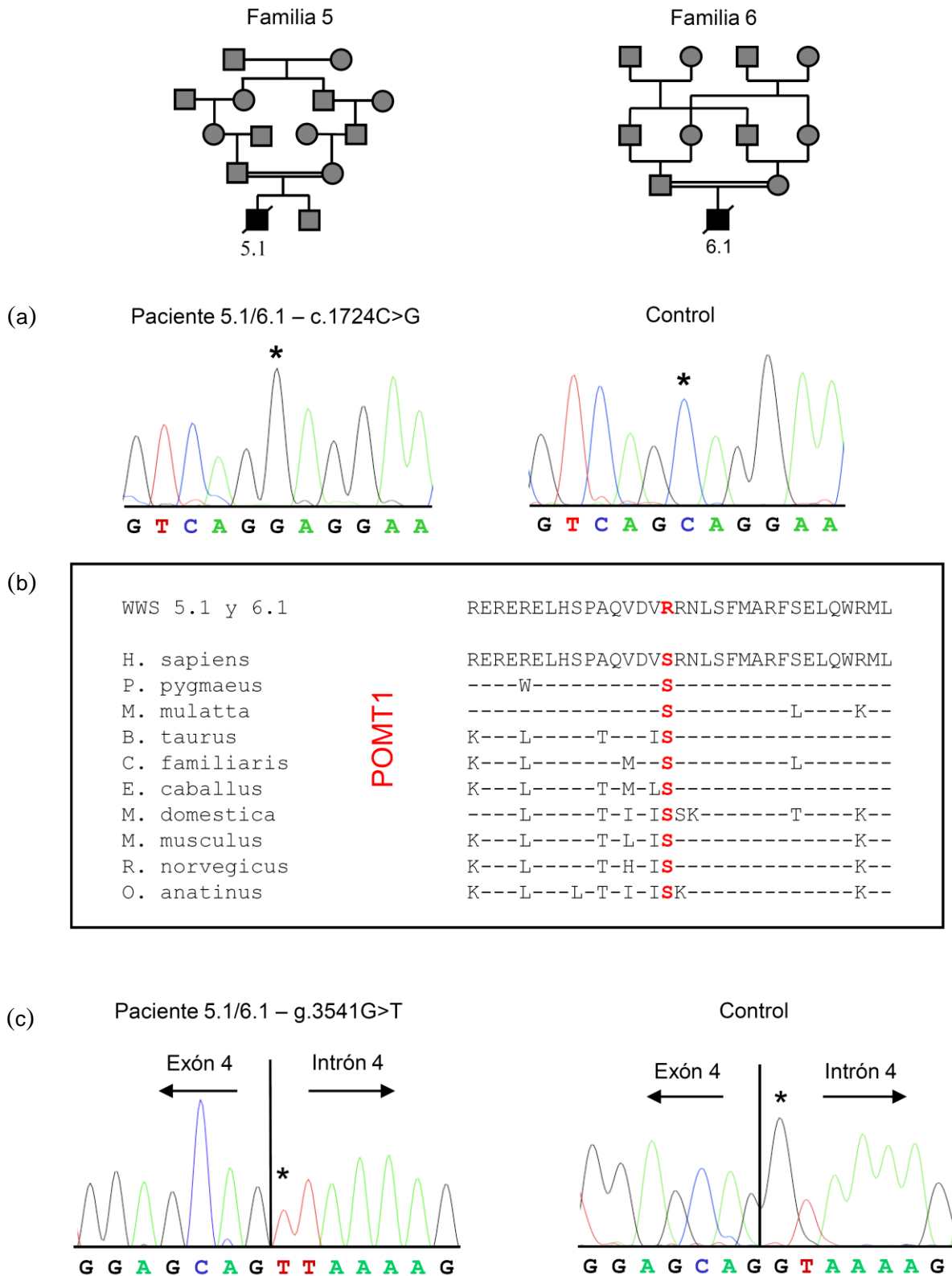


Figura 16. Mutaciones encontradas en los pacientes 5.1 y 6.1. (a) La primera mutación encontrada es la transversión c.1724C>G que provoca la sustitución p.S515R. (b) Esta serina se encuentra conservada en mamíferos, incluso en roedores. (c) La segunda mutación encontrada es la transversión g.3545G>T que se produce en la zona de unión exón-intrón, afectando probablemente al correcto procesamiento de este intrón.



2.1.3.1. Estudio del mensajero de POMT1 en los pacientes 5.1 y 6.1

Se diseñaron parejas de cebadores que amplificasen zonas próximas al inicio del intrón 4 para ver qué sucedía en el mRNA al producirse esta alteración en la secuencia. Los experimentos de amplificación se realizaron tomando como molde el cDNA amplificado mediante RT-PCR, a partir de mRNA total extraído de músculo esquelético congelado de los pacientes.

La hipótesis que se planteó en un principio fue que, al estar alterada la zona de reconocimiento del intrón 4, éste permanecería en el mensajero. Se generaría entonces un codón de terminación prematuro en el triplete 97, tal como se muestra en la Figura 17a, dando lugar a una proteína de 96 aminoácidos afuncional. Basándonos en esta hipótesis, diseñamos una serie de amplificaciones entre cebadores intrónicos y exónicos de tal forma que los productos sólo pudiesen ser amplificados en el mRNA mutado de los pacientes 5.1 y 6.1 (Figura 17b). Además, se podrían distinguir aquellos fragmentos amplificados a partir de posible DNAg residual según el tamaño (Figura 17b).

Así, la pareja de cebadores 21D/i4R que ceba en el exón 3 e intrón 4 respectivamente, darían lugar a un fragmento de 464 pb en el posible DNAg residual y de 282 pb en el cDNA alterado de los pacientes 5.1 y 6.1. De la misma forma, la pareja de cebadores i4D/9R que ceba en el intrón 4 y el exón 6 respectivamente, darían lugar a un fragmento de 1.667 pb en el DNAg residual (no amplificable por su longitud al haber sido amplificado a partir de mRNA extraído de musculo congelado y encontrarse por lo tanto muy fragmentado) y de 281 pb en el cDNA. Ninguna de las dos parejas amplificaría en el cDNA de un individuo normal. Sin embargo, sólo se observaron en el gel de agarosa bandas correspondientes a los fragmentos amplificados de DNAg residual, y ninguna correspondiente a los tamaños esperados para un cDNA que conservase el intrón 4 (datos no mostrados).

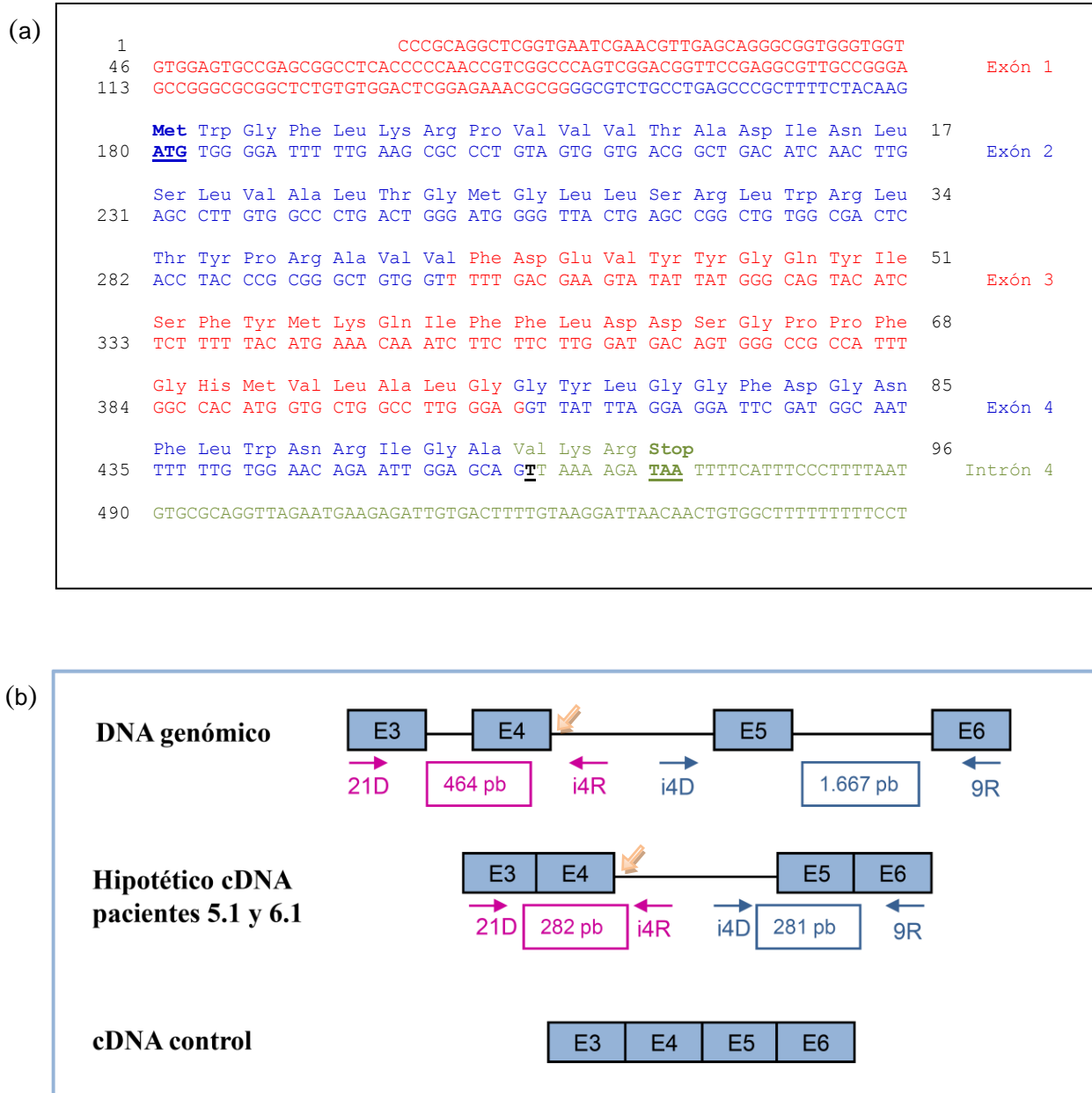


Figura 17. Análisis de la mutación g.3541G>T en los individuos 5.1 y 6.1 (a) Secuencia de aminoácidos correspondiente a la traducción del mRNA del gen *POMT1* en el caso de que no se eliminase el intrón 4 como consecuencia del cambio de nucleótido al inicio del mismo. La mutación g.3541G>T (nucleótido 460 en esta secuencia) se muestra en negro y subrayado. Los exones impares se muestran en rojo y los pares en azul. En verde se indica la parte inicial del intrón 4. También están en negrita y subrayado el ATG iniciador y el nuevo codón de terminación TAA. (b) Productos de la amplificación entre cebadores de los exones 3 y 6, y del intrón 4 de *POMT1*. Se muestran las amplificaciones que resultarían del DNAg por posibles restos en las muestras de cDNA. En el cDNA control no amplificarían ninguna de las dos parejas 21D/i4R o i4D/9R, ya que los cebadores intrónicos i4R e i9D no pueden cebar en el mRNA. La flecha naranja indica el punto de mutación.



Nos planteamos entonces la posibilidad de que al no encontrar la secuencia consenso adecuada en el inicio del intrón 4, la maquinaria de procesamiento del mRNA tomase en su lugar la secuencia consenso del siguiente intrón, perdiéndose así el exón 4 al completo. Realizamos entonces una amplificación con la pareja de cebadores 21D/9R, que debería dar lugar a un fragmento de 331 pb en el cDNA control, de 281 pb en el cDNA mutado de los pacientes y de 1.245 pb en el DNAg residual (Figura 18a). Efectivamente, el fragmento amplificado correspondía en el gel de agarosa con el tamaño de 280 pb, y al ser secuenciado, se verificó la pérdida completa del exón 4 en el mRNA de los pacientes 5.1 y 6.1 (Figura 18b). La secuencia de todos los cebadores empleados en esta experimentación se encuentra en la tabla 2, apartado 2.5 de “Materiales y Métodos”. La segunda mutación encontrada en estos dos pacientes se describe por tanto como p.Gly77_Ala93del.

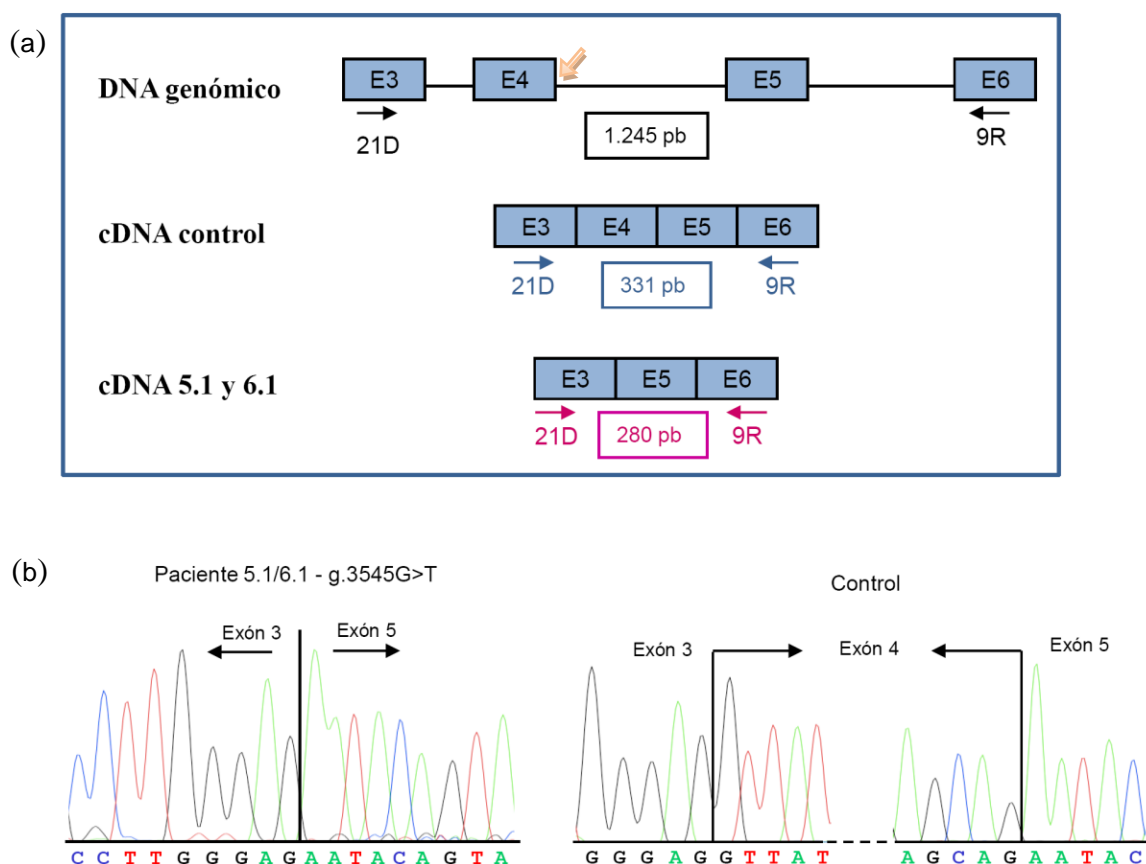


Figura 18. Análisis de la mutación g.3541G>T en los individuos 5.1 y 6.1 (continuación). (a) Posibles resultados de la PCR 21D/9R en el DNA genómico residual, en el cDNA control y en el cDNA de *POMT1* en los pacientes. (b) En el cDNA de los pacientes 5.1 y 6.1 se observa cómo se pierde el exón 4 completo de *POMT1* al amplificar esta parte del gen. La flecha naranja indica el punto de mutación.



2.2. Análisis mutacional del gen de la *fukutina*. El gen de la *fukutina* se muestra como la tercera causa más probable de los casos de WWS

2.2.1. Paciente 3.1

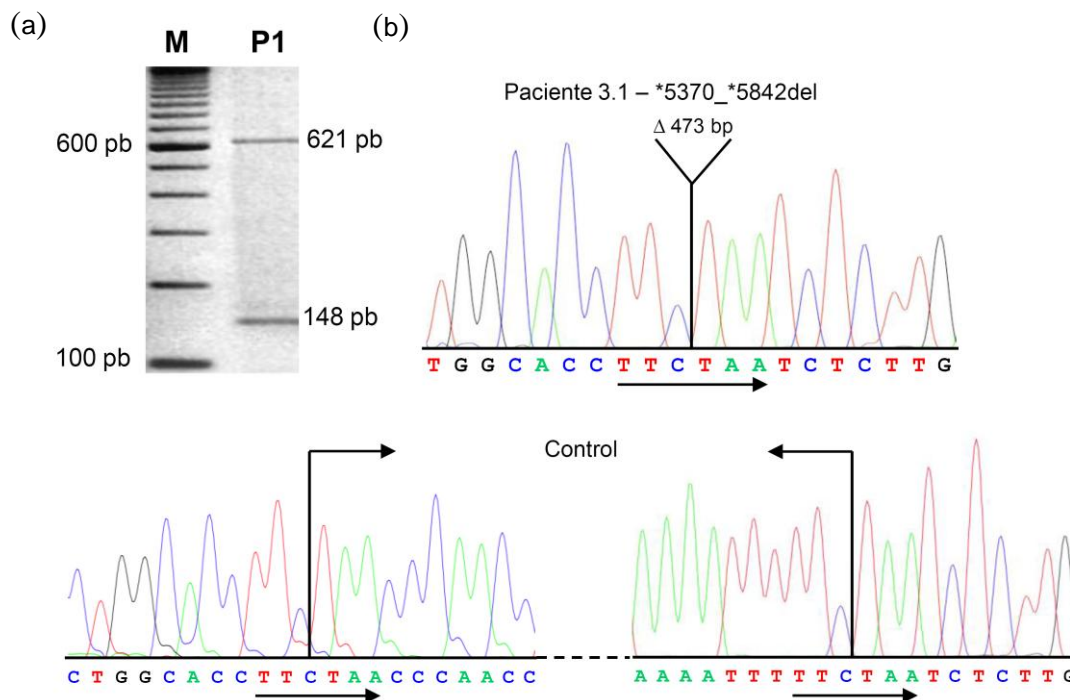
En la paciente 3.1 se ha detectado una mutación en la secuencia codificante del gen de la *fukutina*. La mutación encontrada consiste en una transición c.484G>A, que da lugar a la sustitución p.Gly125Ser (Figura 19a) (Cotarelo *et al.*, 2008). La mutación es detectada en heterocigosis en el enfermo 3.1. Esta glicina se encuentra conservada en vertebrados (Figura 19b).



Figura 19. Primera mutación encontrada en el gen de la *fukutina* en la paciente 3.1. (a) Mutación c.373G>A que provoca la sustitución p.Gly125Ser. (b) Esta glicina está conservada en vertebrados.



Al analizar el resto de la secuencia codificante del gen no se encontraron mutaciones adicionales. Sin embargo, al realizar la amplificación de la parte final no codificante del exón 10 (último exón del gen) donde se encuentra la señal de poliadenilación, se produjeron dos fragmentos de diferente tamaño. El tamaño predicho para el fragmento amplificado era de 621 pb. Uno de los dos fragmentos observados correspondía al tamaño esperado, mientras que el otro correspondía a un tamaño de aproximadamente 150 pb (Figura 20a). Ambos fragmentos fueron purificados y secuenciados.



(c)

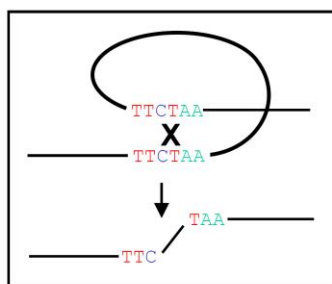


Figura 20. Segunda mutación encontrada en el gen de la *fukutina* en la paciente 3.1. (a) Producto de PCR resultante de la amplificación de la parte final del exón 10. Se observan en el gel de agarosa dos fragmentos de 621 pb y 148 pb, respectivamente. M: Marcador de DNA de 100 bp; P1: Paciente 1. (b) Delección de 473 pb en la zona 3' no traducida del gen de la *fukutina*, en comparación con la secuencia control indicada debajo. (c) Mecanismo por el cual podría haber ocurrido la delección de la zona final del exón 10 del gen de la *fukutina* en esta paciente



El fragmento de 621 pb correspondía a la secuencia esperada, pero al analizar la secuencia del fragmento de menor tamaño, que resultó ser de 148 pb de longitud, se encontró una deleción de 473 pb en la región 3' no traducida del gen, desde los nucleótidos *5370 al *5842 (Figura 20b) (Cotarelo *et al.*, 2008). El hecho de que esta deleción incluya la señal de poliadenilación del gen de la *fukutina* la hace muy significativa. Al examinar la secuencia delecionada y las zonas flanqueantes se encontraron dos repeticiones directas (subrayadas con flechas en la Figura 20b), por lo que se pensó que podría haber ocurrido una recombinación entre estas repeticiones, dando lugar a la pérdida de la secuencia intermedia (Figura 20c).

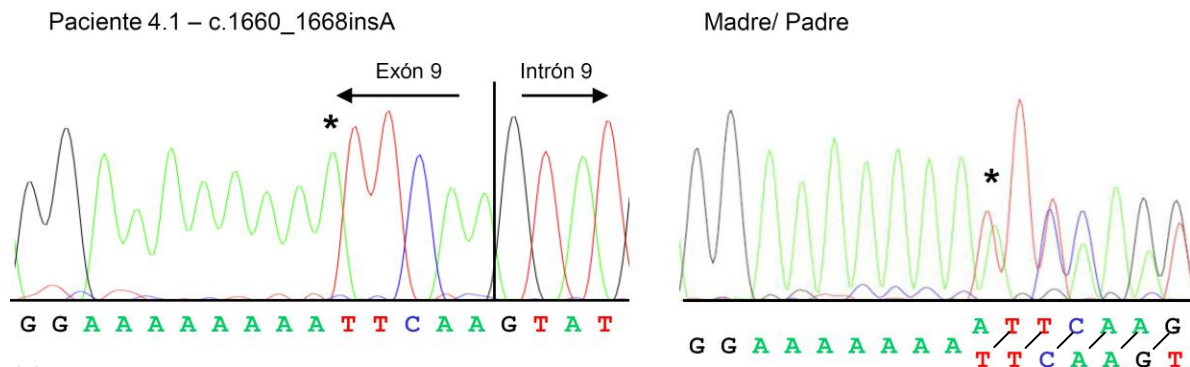
Como última comprobación se verificó que esta paciente no es portadora de la inserción del retrotransposón tipo SVA mediante el método de PCR de triple-cebador descrito por Watanabe *et al.* (2005) (datos no mostrados).

2.2.2. Familia 4

La mutación encontrada en esta familia es una inserción de una adenina en un tramo de 7 adeninas en el exón 9, c.1660_1668insA, del gen de la *fukutina* (Figura 21a). Esta inserción provoca un cambio de pauta de lectura a partir del aminoácido 390 que hace que se sustituyan los últimos 71 aminoácidos por otros 12 distintos, generándose un codón de terminación prematuro en el aminoácido 403. Esta mutación es detectada en homocigosis en el enfermo 4.1. Se comprueba que ambos padres son portadores de la mutación en heterocigosis, para verificar que no ha sido producida *de novo* en uno de los alelos o que se trate de un fenómeno de disomía uniparental (Figura 21a). Se ha comprobado la existencia de la mutación c.1660_1668insA en el mRNA del individuo afectado y de los padres, a partir de mRNA total extraído de células en cultivo (Figura 21b) (Cotarelo *et al.*, 2008).



(a) DNA genómico



(b) cDNA

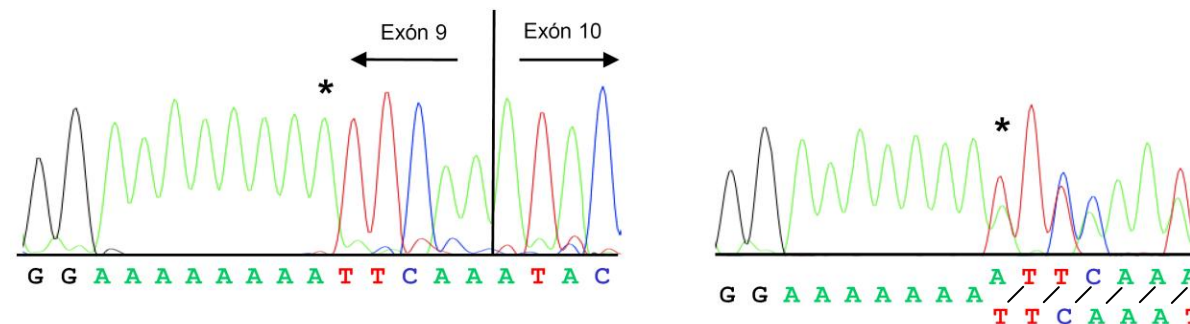


Figura 21. Mutación en el gen de la *fukutina* en la familia 4. (a) La mutación c.1660_1668insA, que se predice en F390I_403X en el DNA genómico. El paciente 4.1 es homocigoto para esta inserción y ambos padres son portadores. (b) Verificación de esta mutación en el mRNA, tanto en el individuo afectado como en los padres.

2.3. Alfa-distroglicanopatías aún por caracterizar

2.3.1. Familia 7

Las regiones codificantes completas de los genes *POMT1* y *fukutina* han sido analizadas en los individuos 7.1, 7.2 y 7.3 de esta familia sin encontrar alteraciones de secuencia. Sin embargo, esta familia se incluye en este trabajo al tratarse de una α -distroglucanopatía, tal como se verá más adelante en las secciones 3.1 y 3.2.



3. ANATOMÍA PATOLÓGICA

En aquellos pacientes de los que se dispone de muestra de tejido muscular congelado se han realizados diversos estudios de anatomía patológica con el fin de analizar el estado de proteínas que estarían afectadas en este tipo de patologías como la laminina, el distroglicano y POMT1. Los estudios realizados han consistido en el análisis de estas proteínas mediante Western blot e inmunofluorescencia.

3.1. Estudios de Western blot. α -DG, β -DG y laminin overlay. Análisis del estado de glicosilación del α -distroglicano

3.1.1. El α -DG glicosilado no se detecta en extracto de proteína total de pacientes de WWS

Para analizar el estado del α -DG en tejido muscular de pacientes de WWS, se extrajo proteína total de músculo congelado de los pacientes 5.1, 6.1 y 7.1 (así como de un individuo control) con el fin de comprobar el estado de glicosilación del mismo. Para ello se ha utilizado el anticuerpo VIA-4 y la técnica del “laminin overlay”.

Como se indica en “Materiales y Métodos”, el anticuerpos VIA-4 reconoce residuos glicosídicos del α -DG, y el ensayo de “laminin overlay” se basa en la afinidad que tiene la merosina (laminina muscular) por el α -DG glicosilado. Mediante la utilización de estas dos técnicas sólo se detectaría el α -DG cuando se encontrase correctamente glicosilado.

Observamos en la Figura 22 que en los carriles correspondientes a los extractos de los pacientes 5.1, 6.1 y 7.1 hay una ausencia de señal en la membrana que se han incubado con el anticuerpo VIA-4 (Figura 22a). En el control, se observa una amplia banda alrededor de los 180 KDa que corresponde al α -DG glicosilado. En la membrana donde se ha realizado la técnica del “laminin overlay” (Figura 22b), se observa el mismo patrón, ya que al carecer los pacientes de α -DG glicosilado, no se une la merosina ni por lo tanto el anticuerpo anti-laminina. Además, se observa una banda clara de 200 KDa correspondiente a la merosina propia de los tejidos.



3.1.2. El β -DG se detecta correctamente en extracto de proteína de pacientes de WWS

Tal y como se observa en la Figura 22c, el β -DG se detecta de forma correcta, tanto en los extractos de proteína de los pacientes 5.1, 6.1 y 7.1 como en el del individuo control, con un tamaño molecular de 43 KDa que aumenta ligeramente hasta los 45 KDa debido a fenómenos de glicosilación.

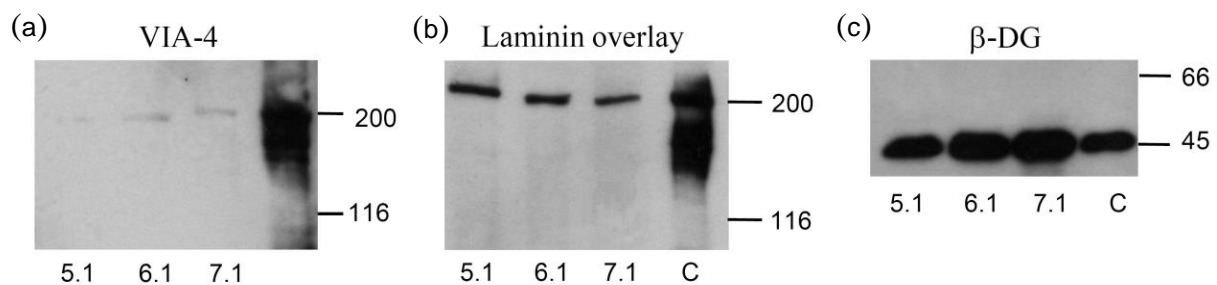


Figura 22. Western blot de los pacientes 5.1, 6.1 y 7.1. (a) Detección con el anticuerpo anti α -DG (VIA-4). Se observa una ausencia total de señal en los tres primeros carriles correspondientes a los tres pacientes. (b) Ensayo de “laminin overlay” donde se observa un patrón muy similar al presentado en el Western blot anti- α -DG. (c) El β -DG se detecta de forma correcta y abundantemente, tanto en los pacientes como en el individuo control. Se indican los tamaños moleculares de proteínas marcadoras: 200 KDa, 116 KDa, 66 KDa y 45 KDa.



3.2. Estudios de Inmunofluorescencia

3.2.1. Estudio de proteínas implicadas en el complejo DGC. El α -DG glicosilado no se detecta en criosecciones musculares de pacientes de WWS

Para confirmar lo observado mediante Western blot en estos mismos pacientes, se realizaron criosecciones de tejido muscular de 10 micras de grosor y fueron incubadas con los mismos anticuerpos utilizados en el Western blot: VIA-4, anti-laminina y anti β -DG. En todas las inmunotinciones mostradas se puede apreciar que el tamaño y forma de las fibras en los pacientes es sustancialmente diferente al del observado en el individuo control debido a la afectación muscular manifestada por estos pacientes, y que ya se observaba en las tinciones de HE en la Figura 8 (apartado 1 de “Materiales y Métodos”). Igualmente, en todas ellas se muestra el individuo control a un aumento de 40x, con la barra indicadora de tamaño señalando 50 μ m; y los pacientes a un aumento de 63x, con la barra indicadora de tamaño señalando 40 μ m.

Entre los anticuerpos que reconocen residuos glicosídicos del α -DG (anticuerpos VIA-4 y IHH-6) se eligió el VIA-4 para realizar las inmunofluorescencias por producir, en igualdad de condiciones, una mayor señal en el individuo control (Figura 23a). En el tejido de este individuo puede observarse el patrón de membrana plasmática con ambos anticuerpos. En los tejidos de los individuos afectados, 5.1, 6.1 y 7.1 hay una ausencia total de señal por parte de estos anticuerpos.

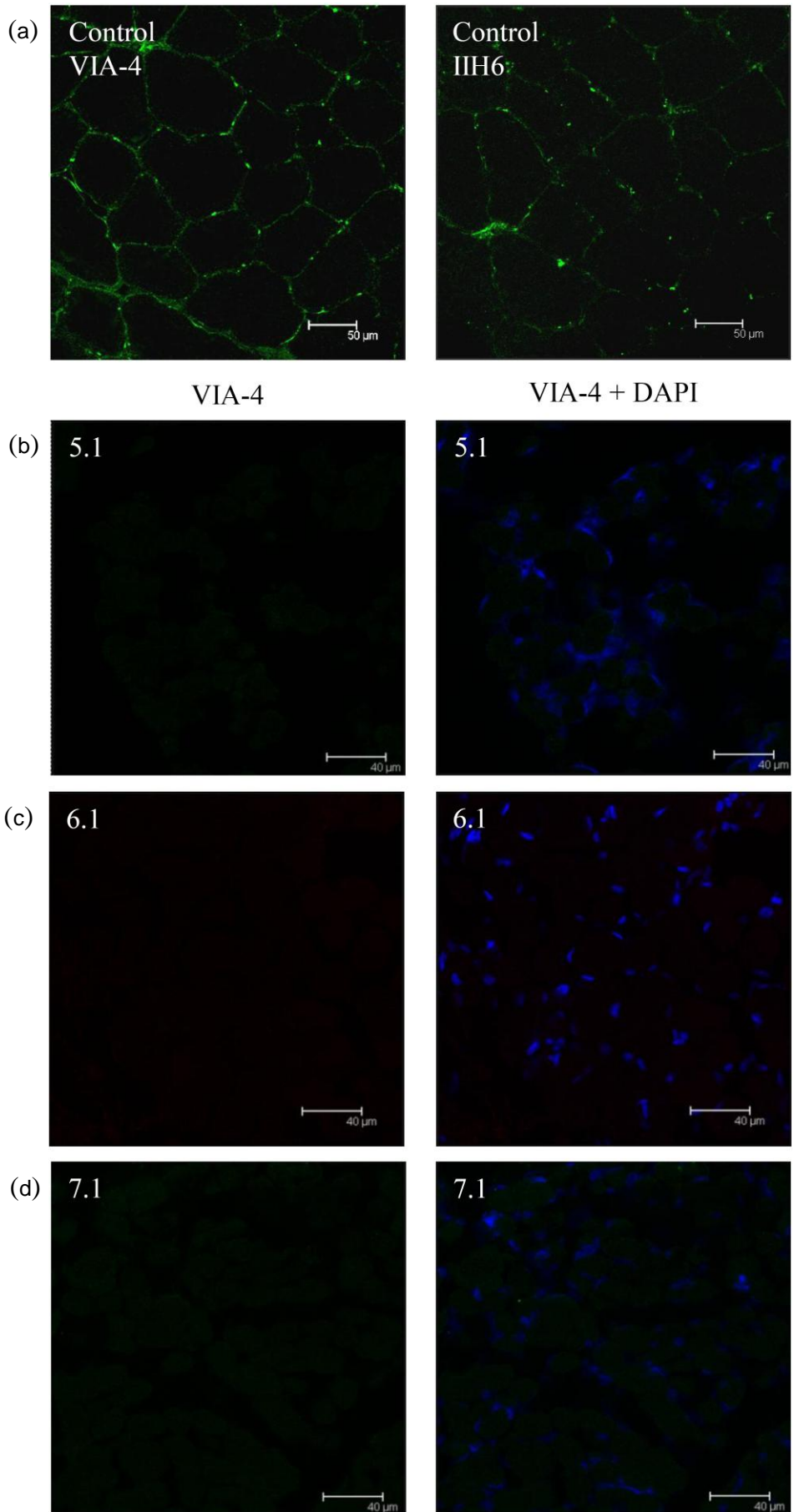


Figura 23. Inmunofluorescencia sobre tejido muscular de los pacientes 5.1, 6.1 y 7.1. (a) Detección en el tejido muscular de un individuo control, del α -DG con los anticuerpos VIA-4 (izquierda) y IIIH-6 (derecha), en la que se observa el patrón de membrana, aumento 40x. Para el resto de la figura se muestra en la columna de la izquierda la detección con el anti-cuerpo VIA-4 y en la columna de la derecha la detección conjunta del anticuerpo VIA-4 con DAPI en los pacientes 5.1 (b), 6.1 (c) y 7.1 (d), aumento 63x. Se puede observar la ausencia total de señal por parte del anticuerpo VIA-4 en los individuos afectados de WWS. Individuo control: aumento 40x; pacientes 5.1, 6.1 y 7.1: aumento de 63x. Emisión en verde: anticuerpo secundario Alexa 488; emisión en rojo: anticuerpo secundario Alexa 594.



Adicionalmente, se realizaron inmunofluorescencias contra el anticuerpo p α DAG, que reconoce la zona peptídica del α -DG (Figura 24). Este anticuerpo, generado contra un péptido del α -DG de pollo cercano a su extremo N-terminal, solamente es funcional en técnicas de inmunofluorescencia. Se observa que, en el músculo de los pacientes, el anticuerpo que reconoce residuos glicosídicos del α -DG (anticuerpo VIA-4) no emite señal (Figura 23b, 23c y 23d), en tanto que el anticuerpo p α DAG sí lo hace (Figura 24b, 24c y 24d). Esto demuestra que el α -DG de estos pacientes se encuentra en estado de baja glicosilación. Tanto en el individuo control como en los pacientes se observa el patrón de membrana lo que indica la localización de la región proteica del α -DG correctamente en la membrana sarcoplásmica,

Sin embargo, también se observa señal en el interior de la célula con el anticuerpo p α DAG, lo cual se debe a la detección del α -DG en proceso de modificación post-traducciona en el retículo sarcoplásmico. En la Figura 24c y 24d se muestra el mismo plano horizontal de tejido del paciente 6.1 enfocado a distintos planos verticales, con la finalidad de que se observe mejor la señal tanto en la membrana como en el interior de la célula.

En la Figura 25 se muestran las inmunotinciones con los anticuerpos anti- β -DG y anti-laminina. Se observa claramente el patrón de membrana tanto del β -DG como de la laminina, por lo que se demuestra que estas proteínas no se encuentran afectadas, y se detectan y localizan de la forma esperada, tanto en el individuo control como en los pacientes. A primera vista parece que la localización de ambas proteínas es similar, aunque observando con detenimiento se comprueba que la señal emitida por el anticuerpo anti- β -DG dibuja el contorno de las células, ya que es una proteína integral de membrana, mientras que la señal del anticuerpo anti-laminina se sitúa justo por fuera del sarcolema, donde se encuentra anclada la laminina.

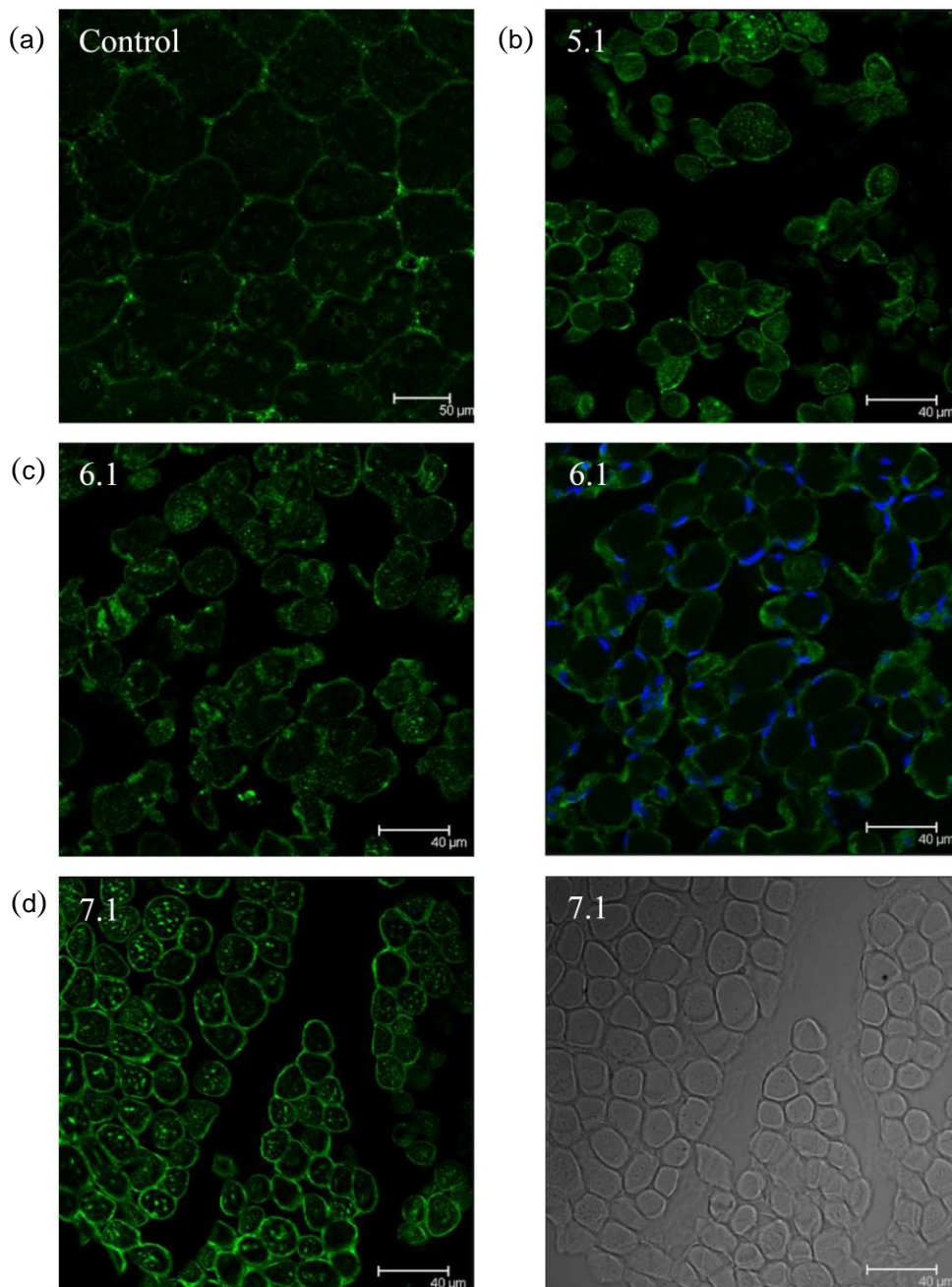
 $p\alpha$ DAG

Figura 24. Inmunotinciones fluorescentes sobre tejido muscular de los pacientes 5.1, 6.1 y 7.1 con el anti-cuerpo $p\alpha$ DAG. Tanto en el tejido del individuo control como en el de los pacientes, se observa el patrón de membrana del α -DG, detectándose también en el interior de la célula (por procesos de modificación post-traducional). Las dos fotos que se muestran del individuo 6.1 corresponden al mismo plano horizontal pero distinto plano vertical, con el fin de mostrar en la primera la detección de la señal en el interior de la célula y en la segunda la detección en la membrana, en el plano en que mejor se detectan los núcleos teñidos con DAPI. En el individuo 7.1 se muestra el mismo plano horizontal en campo claro. Individuo control: aumento 40x; pacientes 5.1, 6.1 y 7.1: aumento de 63x. Emisión en verde: anti-cuerpo secundario Alexa 488.



β -DG

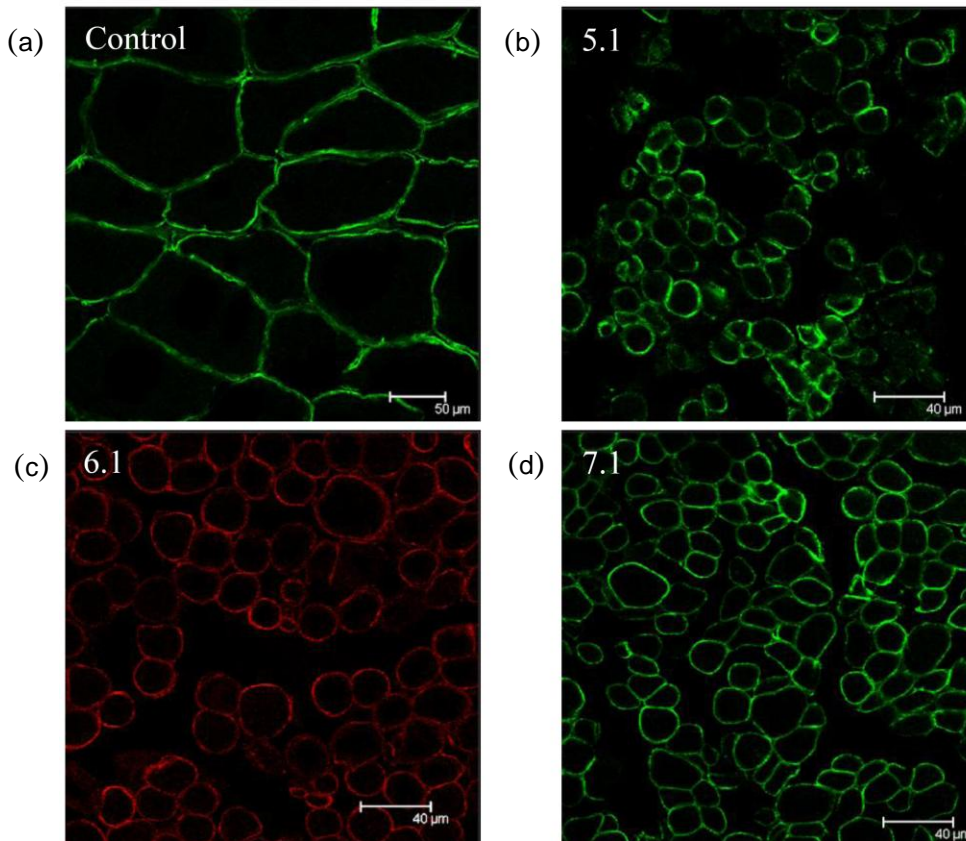
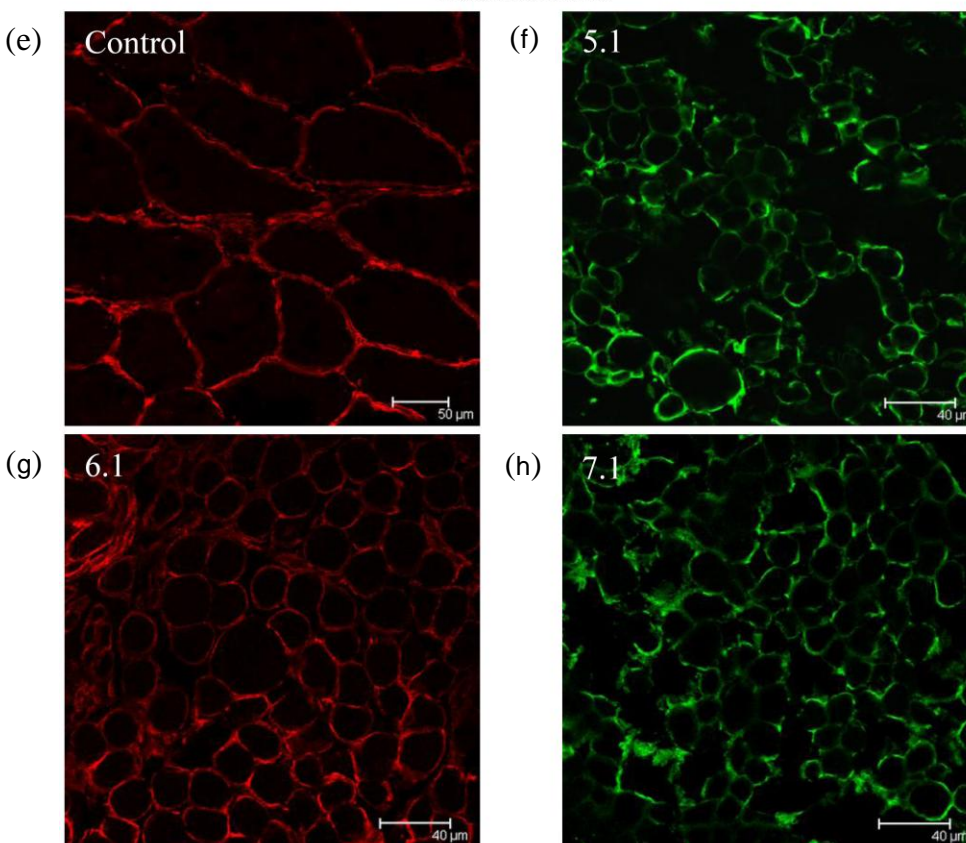


Figura 25. Inmunotinciones fluorescentes con los anticuerpos anti- β -DG y anti-laminina sobre tejido muscular de los pacientes 5.1, 6.1 y 7.1. Ambas proteínas exhiben una localización de membrana con ligeras diferencias, ya que el β -DG es una proteína integral de membrana y la laminina se localiza en la parte exterior de la célula. Tanto en el individuo control como en los pacientes la señal detectada es la esperada, por lo que ninguna de estas proteínas se encuentra afectada en ninguno de estos pacientes. Individuo control: aumento 40x; pacientes 5.1, 6.1 y 7.1: aumento de 63x. Emisión en verde: anticuerpo secundario Alexa 488; emisión en rojo: anticuerpo secundario Alexa 594.

Laminina





3.2.2. Estudio de la proteína POMT1. POMT1 pierde su localización en el retículo sarcoplásmico de la célula muscular y en la zona subsarcolémica en aquellos pacientes con mutación en el gen

El estudio de la proteína POMT1 se llevó a cabo en los individuos 5.1, 6.1 y 7.1. Este estudio era especialmente interesante en los pacientes 5.1 y 6.1 ya que, como se muestra en la Figura 17b, se ha confirmado que la mutación detectada genera la pérdida del exón 4 al completo. Este exón contiene un número de nucleótidos múltiplo de 3, por lo que su pérdida no genera alteración en la pauta de lectura.

El anticuerpo anti-POMT1, como se indica en la sección 3.5 de “Materiales y Métodos”, está generado contra la zona del “loop” 5 de la proteína, concretamente contra un péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 510-524 de POMT1 (VEEHRYGASQEQRER). El exón 4 se encuentra en la zona del “loop” 1 (ver posiciones en la figura 1, página 36), por lo que su pérdida no originaría ausencia de la zona de reconocimiento del anticuerpo en los pacientes 5.1 y 6.1. Sin embargo, no se descartó la idea de que la proteína podría no detectarse de forma correcta al faltarle este exón. En la Figura 26 se muestran la inmunotinciones del individuo control y de los pacientes 5.1, 6.1 y 7.1 con el anticuerpo anti-POMT1 (Figura 26a, 26c, 26e, y 26g) y las inmunotinciones con el anticuerpo anti-calnexina, marcador de retículo endoplásmico (Figura 26b, 26d, 26f, y 26h). La inmunotinciones con los anticuerpos anti-POMT1 y anti-calnexina dan lugar a un patrón muy similar, ya que la proteína POMT1 se localiza en el retículo sarcoplásmico (RS).

En las células musculares, el RS forma un entramado alrededor de los túbulos T transversos que son continuos con la membrana sarcoplasmática. Como se observa en el individuo control, POMT1 se detecta formando parte de este entramado en el RS en el interior de la célula muscular y en la zona subsarcolémica, justo en el espacio interior de la membrana sarcoplasmática (Figura 26a). No obstante, en los pacientes 5.1 y 6.1 se encuentran diferencias: mientras que la calnexina se detecta de la forma esperada (Figura 26d y 26f), POMT1 se localiza solo en ciertas partes de la zona subsarcolémica y de manera difusa por el interior de la célula (Figura 26c y 26e).



POMT1

Calnexina

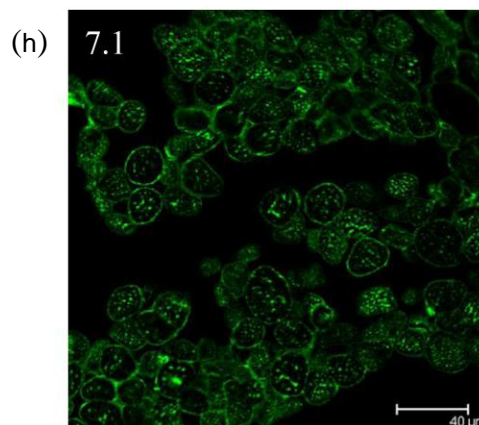
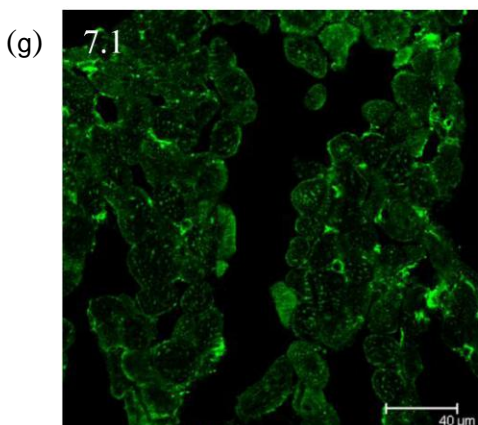
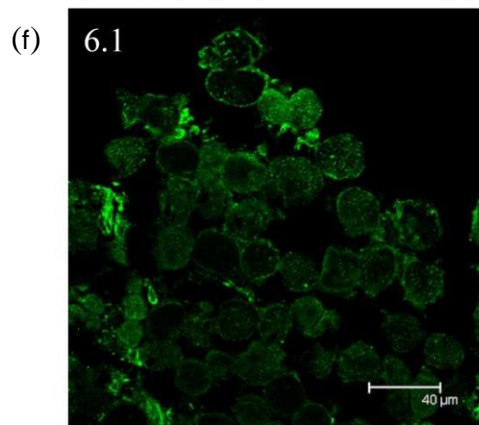
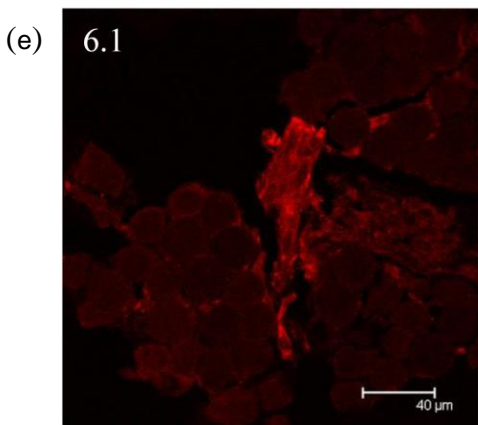
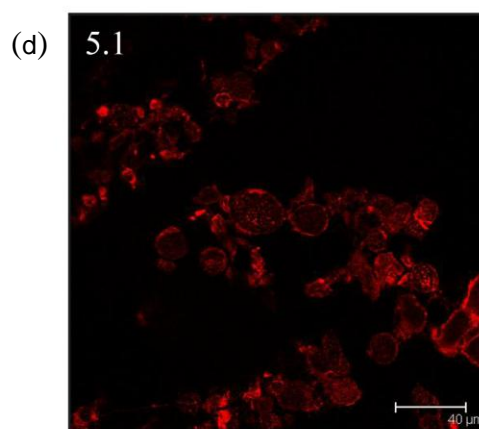
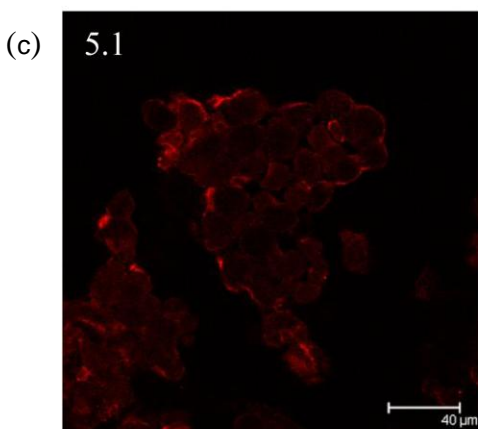
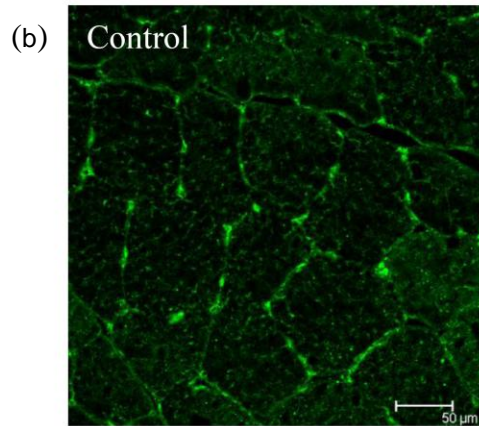
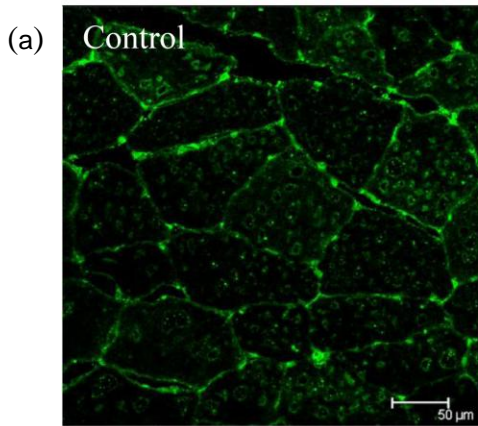


Figura 26. Inmunotinciones fluorescentes con los anticuerpos anti-POMT1 (sp26) y anti-calnexina (marcador de RE) en tejido muscular de los pacientes 5.1, 6.1 y 7.1. Observamos en el individuo control un patrón muy parecido en ambos anticuerpos: localización en el retículo sarcoplásmico y en la zona subsarcolémica. En los sujetos 5.1 y 6.1 la señal de la calnexina se observa de forma correcta, sin embargo la señal emitida por parte de POMT1 es más débil. En el paciente 7.1, sin embargo, vuelve a observarse un patrón similar, tanto en POMT1 como en la calnexina. Individuo control: aumento de 40x; pacientes 5.1, 6.1 y 7.1: aumento de 63x. Emisión en verde: anticuerpo secundario Alexa 488; emisión en rojo: anticuerpo secundario Alexa 594.



En el paciente 7.1 no se ha detectado mutación en el gen *POMT1*, pero el estudio inmunohistoquímico fue realizado igualmente por si aportaba alguna información adicional. En este paciente, la proteína POMT1 se localiza de forma correcta tanto en el interior como en la zona subsarcolémica, mostrando un patrón similar al exhibido por la calnexina (Figura 26g y 26h).

4. ESTUDIOS FUNCIONALES EN CÉLULAS EN CULTIVO DE UN PACIENTE DE WWS (Familia 4)

La oportunidad de disponer de tres líneas celulares correspondientes a los padres y al individuo afectado de un caso de WWS, nos brindó la posibilidad de realizar estudios sobre la manifestación de esta enfermedad en células.

4.1. La *fukutina* como gen responsable de un caso de WWS.

Esta familia WWS fue la segunda de nuestra cohorte de pacientes en ser diagnosticada molecularmente como patología causada por el gen de la *fukutina*. La importancia de este descubrimiento radica en que los dos únicos casos de WWS causados por el gen de la *fukutina* fueron descritos en el año 2003 (de Bernabe *et al.*, 2003; Silan *et al.*, 2003), no habiéndose encontrado ningún otro caso adicional, aparte de los referidos en este trabajo de tesis doctoral, hasta muy recientemente.

4.2. El mensajero de la *fukutina* no sufre “mRNA decay” a pesar de tener la mutación antes de la unión de los dos últimos exones.

El individuo 4.1, homocigoto para la mutación c.1660_1668insA en el gen de la *fukutina* presenta un fenotipo muy severo, como ya se aprecia en la sintomatología descrita en el apartado 1.4 de “Materiales y Métodos”. De modo similar, un individuo afectado de FCMD portador de esta misma mutación en estado de heterocigosis con el retrotransposón, desarrolla un fenotipo de FCMD denominado tipo-WWS debido a la gravedad de sus síntomas. Según esto, podríamos determinar que esta mutación da lugar a una proteína *fukutina* con actividad casi nula. Esto podría deberse a efectos de



decaimiento de mRNA mediado por mutaciones “sin sentido” (en inglés, nonsense mediated mRNA decay), a que la función de la proteína fuese casi nula cuando se pierde la parte final de la misma o a una combinación de ambos factores.

El fenómeno de “*nonsense mediated mRNA decay*” consiste en la eliminación mediante el proteasoma de ciertos mRNA portadores de mutaciones que originan codones de terminación prematuros. Mediante este mecanismo, el mensajero es eliminado de la célula incluso antes de ser transcrito a proteína, por lo que sus niveles en la célula son casi indetectables. La mutación c.1660_1668insA cumplía los requisitos para ser eliminado de esta forma. La comprobación de la posible existencia del fenómeno de “*nonsense mediated RNA decay*” se llevó a cabo mediante RT-PCR cuantitativa. De estos experimentos, cuyos resultados se muestran en la Figura 27, se concluye que la expresión del mensajero de la *fukutina* es independiente de la mutación detectada en este paciente. Se observa en la Figura 27 que la expresión es menor en el paciente 4.1 (180) respecto a la madre 4.2 (181), aunque superior a la expresión del padre 4.3 (182). Otros experimentos han dado lugar a resultados que no confirman un patrón de menor expresión del mRNA de la *fukutina* en el paciente 4.1, ya que en ocasiones la expresión del mRNA de paciente es superior a la de alguno de los padres (datos no mostrados). Según estos resultados no puede establecerse una correlación entre la mutación y el nivel de expresión del mRNA, y tampoco una posible influencia sobre la degradación del mensajero.

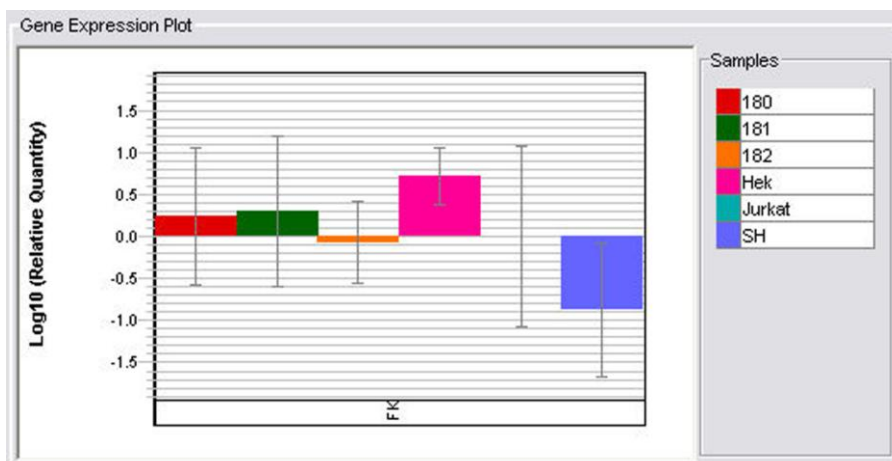


Figura 27. Resultado de un ensayo de RT-PCR cuantitativa para el gen de la *fukutina*. Según estos resultados no parece ocurrir el fenómeno de mRNA “decay” en el paciente 4.1. Leyenda: 180: células GM10180 (paciente 4.1); 181: células GM10181 (madre 4.2); 182: células GM10182 (padre 4.3); Hek: células HEK293T; Jurkat: células Jurkat y SH: células SH-SY5Y.



4.3. El distroglicano se detecta en extractos totales de proteína de linfoblastos

El ensayo de Western-blot realizado con extracto de proteína total de células de esta familia revela que el distroglicano se expresa y traduce a proteína en linfoblastos. Así, en la Figura 28 se observa la banda de 45 kDa correspondiente al β -DG, de lo cual se infiere que el α -DG se expresa también al mismo nivel, puesto que derivan de un único precursor por rotura proteolítica post-traducciona. El α -DG glicosilado no ha podido ser detectado en extractos totales de proteína de dichos linfoblastos inmortalizados, a pesar de utilizar concentraciones de proteína de 200 microgramos.

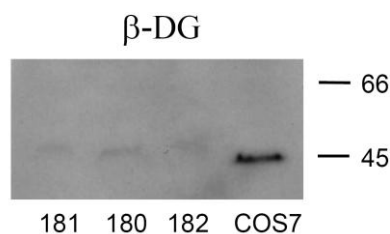


Figura 28. Detección del β -DG en células inmortalizadas de los individuos de la familia 4 con el anticuerpo anti β -DG. Se observa una tenue banda a la altura correspondiente al tamaño de esta proteína. Esto indica que el distroglicano se expresa en estas células. Como control se ha utilizado extracto total de proteína de células COS7

4.4. El α -DG se libera al medio de cultivo de los linfoblastos

Puesto que el β -DG se detecta mediante Western blot en los linfoblastos inmortalizados, quisimos comprobar la razón por la cual no se detectaba el α -DG con el anticuerpo VIA-4. Existían dos posibles razones para este hecho: que al estar creciendo las células en un medio en suspensión la unión alfa-beta se perdiese por rotura mecánica, o bien que tuviese lugar una reducción de la glicosilación del α -DG al ser la sangre un tejido sin matriz sólida a la cual se puedan anclar las células.

Para comprobar cuál de estas hipótesis era cierta se realizó una adaptación del protocolo descrito por Singh *et al.* (2004), con el fin “rescatar” dicho α -distroglicano del medio de crecimiento de las células. Este protocolo se describe en la sección 4.2 de “Materiales y Métodos”. Con este protocolo se logró un resultado positivo de “rescate del α -DG” del medio de cultivo celular. El resultado fue verificado al detectarse señal de α -DG glicosilado mediante el anticuerpo VIA-4 en medio de cultivo de células C2C12 diferenciadas, utilizadas en este caso como control. En la Figura 29 se muestra el resultado del ensayo de Western blot realizado con extractos proteicos del medio de



cultivo de las células GM10180, GM10182 y C2C12 diferenciadas. Se observa en el carril 3, correspondiente a las células C2C12, una señal extensa que corresponde a la detección del α -DG en distintos estados de glicosilación, que se solubiliza en el medio de cultivo al desprenderse de su enlace con el β -DG, posiblemente por rotura mecánica. En el carril 2, perteneciente a las células GM10182, se observa también señal aunque más difusa y menos intensa deduciéndose de esto que el distroglicano presente en el medio de cultivo de estas células está en mucha menor proporción. Por el contrario, en el carril correspondiente a las células GM10180 no se detecta este patrón, lo cual indica una ausencia total de distroglicano glicosilado en el medio de cultivo de estas células, que son portadoras en homocigosis de una mutación en el gen de la *fukutina*.

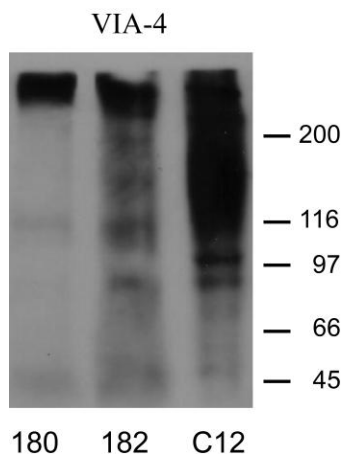


Figura 29. Detección del α -DG presente en el medio de cultivo celular detectado mediante el anticuerpo VIA-4. Se ha utilizado medio de células GM10180 (abreviadas 180), GM10182 (abreviadas 182) y células C2C12 (abreviadas C12) como control positivo. En el carril correspondiente a las células C2C12 se observa una amplia mancha (distintos grados de glicosilación del α -DG). En el carril de las células GM10182 se observa esta mancha mucho menos intensa y en el carril de las células GM10180 no se observa la mancha característica de la detección de esta proteína.

4.5. Sobreexpresión del distroglicano en linfoblastos inmortalizados

El distroglicano se expresa a niveles muy bajos en los linfoblastos, dato obtenido de la base de datos “Gene Expression Omnibus” (GEO) en el NCBI, número de acceso GDS596. Esto ha hecho extremadamente difícil su detección mediante Western blot y también mediante inmunofluorescencia. Así que, para estudiar si la proteína distroglicano se encontraba afectada de alguna forma en las células del paciente de WWS fue necesario sobreexpresarla para poder observarla.

El distroglicano, como se ha indicado en varias ocasiones, se transcribe a partir de un único gen y se escinde en el alfa y beta distroglicano mediante rotura proteolítica. El



distroglicano es una proteína de membrana plasmática y como tal, posee un péptido señal al inicio del mRNA que dirige tanto al alfa como al beta-DG a la membrana. Como se explica en el apartado 4.3.1 de “Materiales y Métodos”, el distroglicano transfectado constaba de epítomos tanto delante como detrás del fragmento clonado, con el fin de detectar ambas proteínas, alfa y beta-DG en igualdad de condiciones. Los epítomos correspondientes fueron: FLAG para el α -DG y c-myc para el β -DG. En este mismo apartado se refiere la realización de dos construcciones distintas del distroglicano (llamadas construcciones A y B), que se diferencian en la incorporación o no incorporación del péptido señal propio del distroglicano. Así pues, la “construcción A” incluye toda su secuencia proteica, incluida la de su propio péptido señal, mientras que la “construcción B” carece del mismo (ver estructura del inicio de los fragmentos clonados en las dos versiones citadas en la Figura 10, apartado 4.3.1 de “Materiales y Métodos”).

Con las dos construcciones del distroglicano se transfectaron células del paciente 4.1 (GM10180) y del padre 4.3 (GM10182) mediante electroporación. Previamente se intentaron transfectar mediante lipofección sin obtener resultados positivos (datos no mostrados). Los resultados de la transfección con las dos construcciones del DG en ambas líneas celulares son los que se detallan a continuación.

4.5.1. El péptido señal propio del distroglicano es importante en linfoblastos para su correcta migración a la membrana. El β -DG se localiza correctamente en la membrana de los linfoblastos inmortalizados

El α -DG y β -DG se detectaron en las células transfectadas mediante anticuerpos contra los epítomos a los cuales se encontraban adheridos. Se analizan primero los datos correspondientes al β -DG detectado con el epítomo C-myc ya que éste no está afectado en tejidos de pacientes con mutación en el gen de la *fukutina* (Silan *et al.*, 2003). Así, en las células del padre sano 4.3 (GM10182) y en las del paciente 4.1 (GM10180), se observó que en aquellas células transfectadas con la construcción A del DG (la que posee la secuencia señal completa del DG además de la PPT-LS) el β -DG se detecta correctamente en la membrana (Figura 30a y 30b).

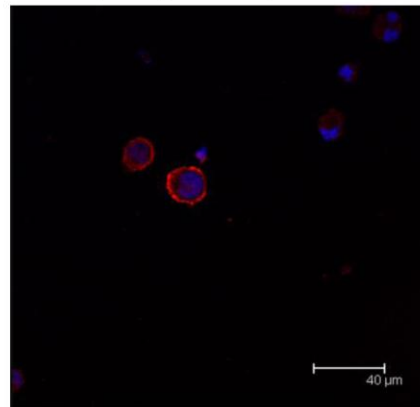
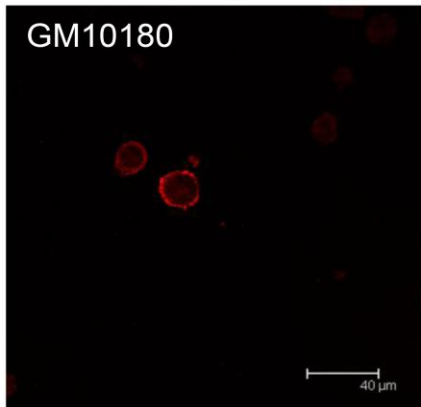


CONSTRUCCIÓN A

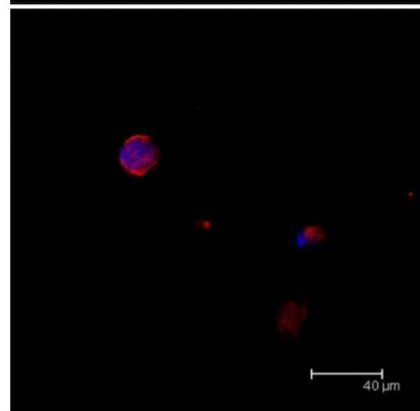
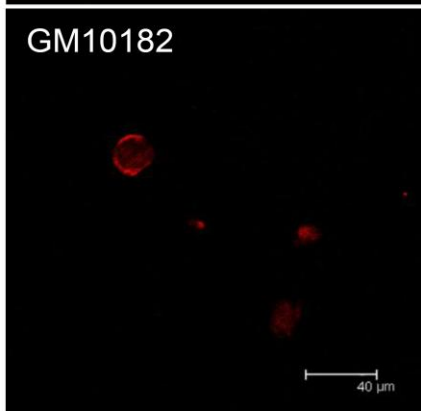
C-myc (β -DG)

C-myc (β -DG)+DAPI

(a) GM10180

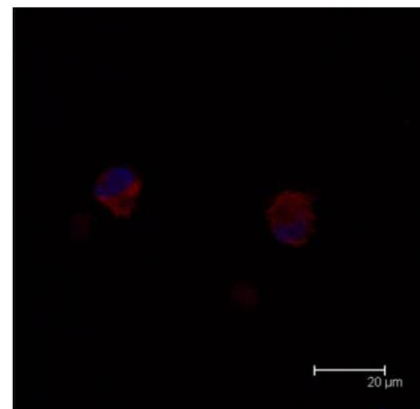
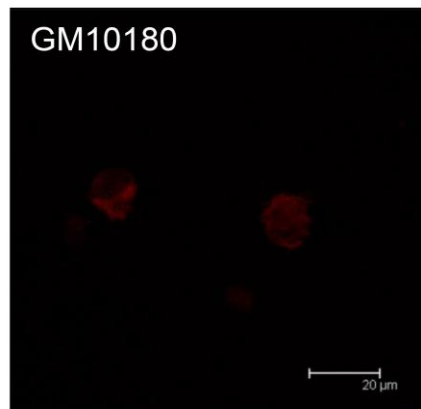


(b) GM10182



CONSTRUCCIÓN B

(c) GM10180



(d) GM10182

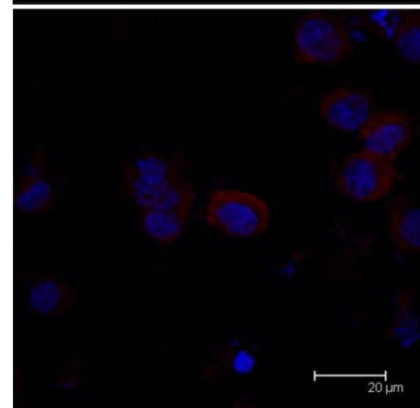
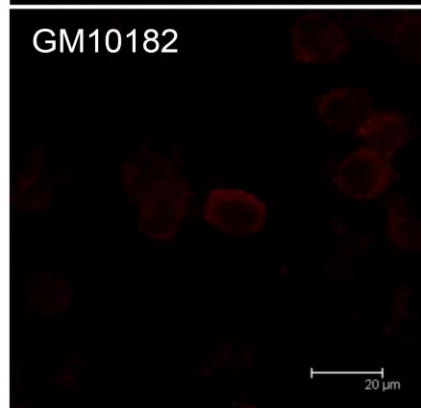


Figura 30. Inmunotinciones fluorescentes en linfoblastos inmortalizados de la familia 4. Se representa el β -DG detectado mediante el epítipo c-myc. En la columna de la derecha se representa además la tinción de los núcleos con DAPI. En la construcción A del distroglicano transfecado se puede observar que tanto en las células del individuo con mutación en homocigosis (GM10180, a), como en las del individuo sano portador de la mutación en heterocigosis (GM10182, b) el β -DG se localiza en la membrana de las células. En la construcción B del distroglicano, sin embargo, se observa una detección de la señal distribuida por el citoplasma en células del individuo afectado (c) y en células del individuo sano (d). Las barras de 40 μ m indican un objetivo de 63x. Las barras de 20 μ m indican este mismo objetivo con un zoom de 2x. En la construcción B se ha tenido que ampliar a este zoom para poder visualizar mejor la distribución citoplásmica. Emisión en rojo: anticuerpo secundario Alexa 594.



Sin embargo, en las células transfectadas con la construcción B, la proteína se observa distribuida por el citoplasma celular, perdiendo por completo la localización de membrana (Figura 30c y 30d). Esto parece indicar que, al menos en linfoblastos, el péptido señal propio del DG es importante para la correcta migración a la membrana.

4.5.2. El α -DG pierde su localización de membrana en las células con mutación en el gen de la *fukutina* en estado de homocigosis

Al analizar lo que ocurría con el α -DG detectado con el epítipo FLAG, se observó un fenómeno curioso: en la construcción A se observaba el α -DG en la membrana celular de las células del individuo sano GM10182, mientras que en las de individuo afectado GM10180 se localizaba en una zona intracelular próxima al núcleo (perinuclear), dando la impresión de quedarse la proteína retenida en el aparato de Golgi (Figura 31a y 31b). Sin embargo, en las células transfectadas con la construcción B del DG se observa una distribución citoplásmica de la proteína α -DG transfectada tanto en las células GM10180 como en las GM10182.

Las dos construcciones del DG se han probado en células SH-SY5Y para observar el comportamiento en otro tipo celular. Sin embargo los resultados obtenidos en estas células son poco concluyentes y no extrapolables a los obtenidos para las células GM10180 y GM10182.



CONSTRUCCIÓN A

Flag (α -DG)

Flag (α -DG)+DAPI

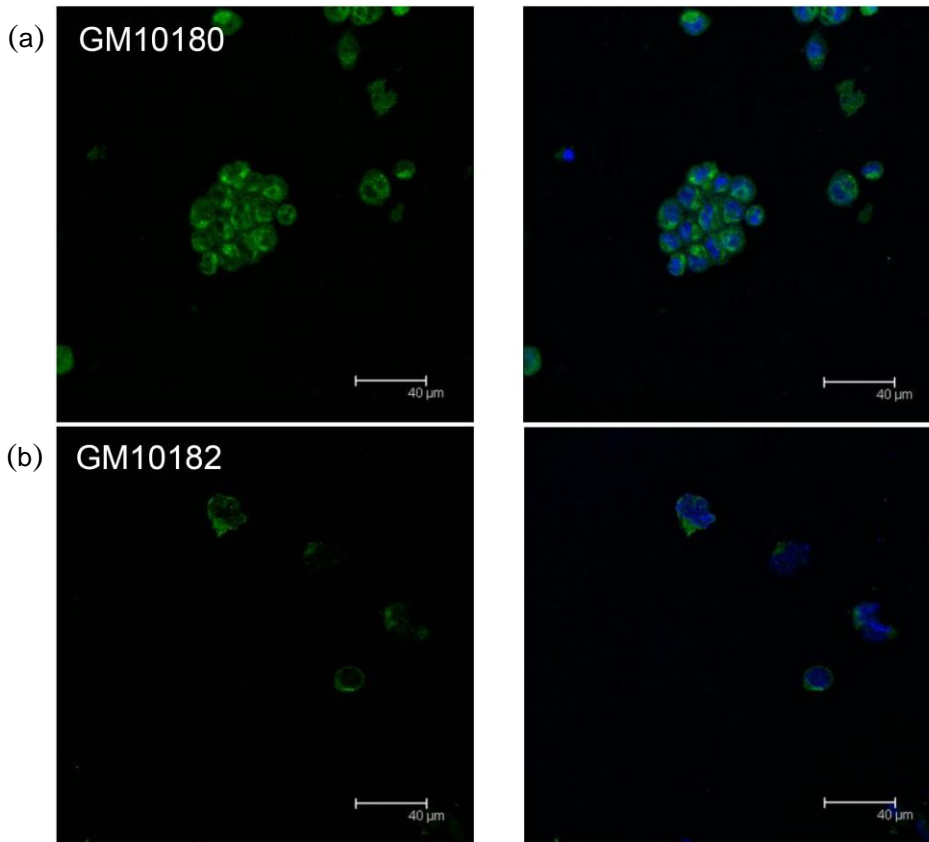
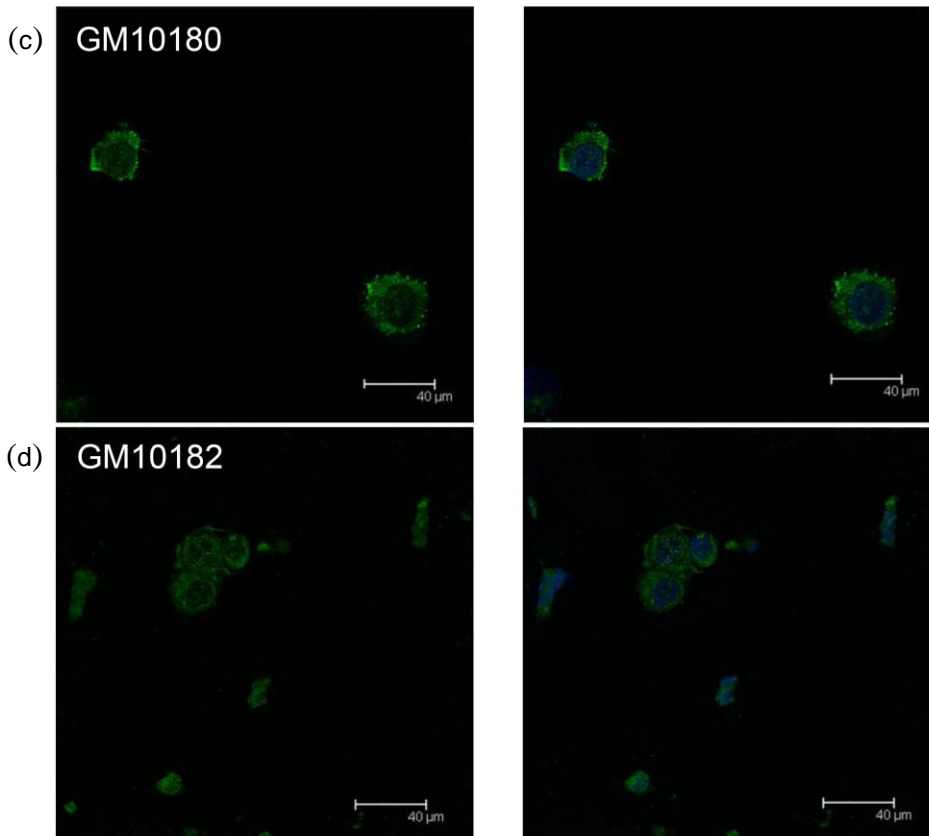


Figura 31. Inmuntinciones fluorescentes en linfoblastos inmortalizados de la familia 4. En todas las fotos se representa el α -DG detectado mediante el epítipo Flag. En la columna de la derecha se representa además la tinción de los núcleos con DAPI. En la construcción A del distroglicano transfectado se puede observar que en las células del individuo con mutación en homocigosis (GM-10180, a) el α -DG se queda retenido en una zona perinuclear, en tanto que en las células del individuo sano (GM10182, b) se localiza en la membrana. En la construcción B se distribuye por todo el citoplasma celular tanto en las células del individuo sano como en las del individuo enfermo.

CONSTRUCCIÓN B





5. MUTAGENESIS DIRIGIDA EN EL GEN *POMT1*

Esta parte del trabajo presentado se encuentra incompleta y se expone como parte realizada de un trabajo más extenso a continuar desarrollando en nuestro grupo de trabajo.

Se reprodujeron las mutaciones encontradas en el gen *POMT1* descritas en la bibliografía hasta la fecha de inicio de esta experimentación, así como las encontradas en nuestro laboratorio en las familias 1 y 2. El objeto de este estudio era comprobar el grado de actividad de las proteínas mutadas de los distintos pacientes e intentar establecer una correlación “mutación–gravedad del fenotipo”.

Sin embargo, durante la realización de la mutagénesis del gen *POMT1* se publicó un trabajo donde se realizaba este mismo procedimiento. Se decidió entonces continuar la experimentación para obtener información de otro tipo, centrando el objetivo del estudio en simular el “comportamiento” que tendrían las células de individuos afectados. Para ello se eligieron tipos celulares neuronales y musculares, ya que el tejido cerebral y el muscular son los más afectados en los pacientes de WWS. Así pues, se transfectaron células SH-SY5Y y células C2C12 con los plásmidos conteniendo el gen *POMT1* mutagenizado con cada mutación de los pacientes (las células C2C12 fueron utilizadas en este caso por su mayor disponibilidad, frente a la escasez de tipos celulares musculares humanos). Como control, en cada experimento se transfectaron además células con el gen *POMT1* “wt”. Las células transfectadas con *POMT1* mutagenizado no exhibieron una morfología anómala. Un ensayo de “laminin overlay” realizado con extracto de proteína total de células transfectadas con los plásmidos mutagenizados tampoco reveló diferencias significativas con respecto a las células transfectadas con el gen *POMT1* “wt” (datos no mostrados).

En un principio se transfectó solamente el plásmido que contenía *POMT1*, aunque está descrito que se requiere de la cotransfección de *POMT1* y *POMT2* para poder medir actividad enzimática. Estos tipos celulares tienen una alta expresión de *POMT1* y *POMT2*. Por ello, se pensó que podría ser suficiente la sobreexpresión de *POMT1* para observar diferencias en morfología, ya que al estar siendo expresada en grandes cantidades sería ésta la que se asociase con la proteína *POMT2* endógena. Sin embargo



los resultados de estas transfecciones no dejaron ver diferencias en las células transfectadas con las distintas mutaciones.

Así pues, surgió la necesidad de realizar una cotransfección POMT1-POMT2. En este punto nos planteamos un nuevo abordaje de la técnica: para dar más exactitud al procedimiento, la expresión de la proteína POMT1 endógena habría de ser eliminada o inactivada. Para ello será necesario el empleo de RNAs de interferencia para así observar únicamente el efecto de las mutaciones. La forma de hacer esto es diseñar siRNAs que se unan de forma complementaria a la zona 5' no traducida del mensajero, después del TGA final. Así, los siRNAs solo se unirán a la proteína endógena ya que la transfectada no posee esta zona. Nos hemos puesto en contacto con la casa comercial Ambion (Applied Biosystems) que nos realizará el diseño de estos siRNAs y será un trabajo a seguir desarrollando en nuestro grupo.

Discusión



El presente trabajo contribuye a la ya iniciada labor del esclarecimiento de las bases moleculares del síndrome de Walker-Warburg. En primer lugar, es oportuno mencionar que este trabajo contribuye a la evidencia de que el gen *POMT1* sigue siendo la causa principal del WWS, como se infiere del hecho de que se han encontrado mutaciones en este gen en 4 de las 7 familias analizadas en el presente trabajo.

Como se menciona en “Introducción”, el WWS pertenece a un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por presentar hipoglicosilación del α -dístroglicano, y que han sido llamadas en conjunto alfa-dístroglicanopatías. Esta hipoglicosilación del α -DG se corrobora en los pacientes 5.1 y 6.1, ya que, como se puede observar en las Figuras 22 y 23 del presente trabajo, el anticuerpo VIA-4 no detecta señal alguna procedente del α -DG glicosilado. Sin embargo, el anticuerpo α DAG detecta señal procedente de la parte peptídica de esta proteína (Figura 24). La hipoglicosilación del α -DG impide la interacción de esta proteína con proteínas de la matriz extracelular, imposibilitando de esta manera la conexión entre el citoesqueleto intracelular y la matriz extracelular. Esta interacción tiene lugar a través del complejo DGC, fundamental para el mantenimiento de la integridad de los tejidos de los que forma parte.

Dentro de las alfa-dístroglicanopatías, el WWS ocupa el puesto de mayor gravedad. Además de la distrofia muscular congénita, los pacientes con WWS presentan anomalías oculares y cerebrales de pronóstico grave. La característica más acusada es la malformación cerebral observada en los pacientes de WWS, que se presenta en forma de lisencefalia tipo II (ausencia de circunvoluciones de la corteza cerebral) como consecuencia de fallos en los procesos de migración neuronal. En la sección 1 de “Materiales y Métodos” puede observarse que la sintomatología detallada para las familias que forman parte del presente trabajo concuerda con esta descripción de la enfermedad. En la familia 7, el enfermo 7.1 presenta estos síntomas aunque menos graves, por lo que se ha catalogado como un caso atípico de WWS.

A pesar de que este síndrome está catalogado dentro de las enfermedades raras por su baja incidencia, ha cobrado relevancia en los últimos tiempos, ya que, dentro de las



distrofias musculares, las alfa-distroglicanopatías han resultado estar ampliamente representadas en la población. En este grupo de enfermedades encontramos las siguientes: WWS, enfermedad MEB, FCMD, MDC1C, MDC1D, LGMD2I y algunos fenotipos intermedios clasificados como DMCs o LGMDs con o sin afectación cerebral.

Mutaciones en el gen *POMT1* se han encontrado mayoritariamente en enfermos diagnosticados de WWS, aunque también se han encontrado en enfermos de CMD y de LGMD con retraso mental (ver Figura 3, en “Introducción”). Esto ofrece una visión de la amplia variedad de fenotipos a los que pueden dar lugar las mutaciones en este gen y de las que el presente trabajo sólo representa una parte.

1. MUTACIONES ENCONTRADAS EN EL GEN *POMT1*

Como se detalla en el apartado 2.1 de “Resultados”, se han encontrado mutaciones en el gen *POMT1* en cuatro de las siete familias analizadas, las familias 1, 2, 5 y 6.

1.1. Familia 1

La mutación encontrada en la familia 1 (c.2098G>A, que predice la sustitución p.Gly700Arg), tiene lugar en la parte final de la proteína POMT1 (ver posición de esta mutación en la Figura 3, página 42). Este aminoácido ha presentado identidad en todas las especies analizadas, tanto en POMT1 como en POMT2 (Figura 12). La mutación detectada da lugar al cambio de un aminoácido neutro por otro cargado positivamente, pudiendo este cambio ser relevante para la función proteica. Una mutación que afecta al mismo aminoácido ha sido anteriormente descrita en otro paciente de WWS, aunque en este último caso la mutación era de cambio de pauta y se encontraba en heterocigosis con otra mutación situada en exón 13 del gen (Figura 3).

Como se observa en la Figura 3, se han descrito mutaciones en esta región final de la proteína POMT1 en pacientes afectados de WWS o de CMDs con afectación cerebral. Por ello se postula que esta zona final de la proteína podría tener un papel importante, ya que da lugar a fenotipos graves cuando se encuentran mutaciones en ella. La mutación encontrada podría afectar a la estructura de la parte C-terminal de la proteína, situada en el lumen del RE (Willer *et al.*, 2003). En otras proteínas integrales de RE se ha demostrado



la existencia de la señal de retención en retículo en las regiones finales de estas proteínas (Ren *et al.*, 2003). La mutación descrita en el individuo 1.2 podría derivar en falta de función debido a una localización errónea de la proteína o bien a un efecto sobre su estructura tridimensional. Carecemos de material genético del paciente 1.1 y del padre 1.3, y a este hecho se añade la ausencia de mutaciones en el individuo 1.4. Por lo cual postulamos que el paciente 1.1 debe haber heredado del padre 1.3 una mutación en una parte diferente del gen que, conjuntamente con la mutación c.2098G>A, dé lugar al fenotipo WWS.

1.2. Familia 2

La mutación detectada en la familia 2 (c.586G>A, que daría lugar a la sustitución p.Ala196Thr) tiene lugar en una región de la proteína en la cual se predice una estructura en alfa-hélice, situada en la zona citoplásmica de POMT1 (ver posición de esta mutación en la Figura 3, página 42). Esta alanina se encuentra conservada en primates y en algunas especies de mamíferos y aves (Figura 13b). Se ha descrito que este tipo de cambio hidrofílico causa pérdida de función en otras proteínas (Vogel *et al.*, 2007). En esta región de la proteína, se halla descrita una mutación muy próxima a la descrita en la familia 2, tan sólo 4 aminoácidos después (Balci *et al.*, 2005). Esta mutación (p.Ala200Pro) se describió en dos pacientes con un tipo nuevo de LGMD2 y retraso mental. Recientemente, se ha encontrado esta misma mutación en pacientes con diagnóstico de CMD en los que también se ha confirmado retraso mental. Postulamos que el efecto de esta mutación no debería ser muy significativo, por analogía con la mutación p.Ala200Pro. Así pues, el paciente 2.1 deberá portar otra mutación en una zona distinta del gen *POMT1*, con un posible efecto fenotípico más grave responsable de la enfermedad.

A pesar de haber realizado un amplio estudio para identificar una mutación en la madre del paciente (individuo 2.2), el resultado de todos los análisis realizados no ha revelado mutación en el gen *POMT1* en este individuo. Por lo tanto, se postula que en el paciente 2.1 puede haberse generado una mutación “de novo” en este gen. Esta mutación, como se acaba de comentar, habrá de ser fenotípicamente significativa.



1.3. Pacientes 5.1 y 6.1

En los pacientes 5.1 y 6.1 se han encontrado dos mutaciones en el mismo gen, *POMT1*, encontrándose ambas mutaciones en homocigosis. La primera mutación encontrada (c.1724C>G, que daría lugar a la sustitución p.Ser515Arg) tiene lugar en la parte final del “loop” 5 de *POMT1* (ver posición de esta mutación en la Figura 3, página 42). Esta serina está conservada en los mamíferos analizados (Figura 16b). Esta misma sustitución ya había sido descrita en un enfermo de WWS, si bien en este caso se describió en heterocigosis sin que fuese hallada una segunda mutación en el gen *POMT1* (Currier *et al.*, 2005). La segunda mutación encontrada en los pacientes 5.1 y 6.1 se produce en la zona de unión exón-intrón, al inicio del intrón 4 (g.3545 G>T, Figura 16c), afectando al correcto procesamiento del mRNA. Como se demuestra en la Figura 18b, se verificó la pérdida completa del exón 4 en el cDNA de *POMT1* de los paciente 5.1 y 6.1. Probablemente, la alteración de este nucleótido del inicio del intrón 4 dé lugar a que la maquinaria de procesamiento de RNA reconozca como válida la secuencia consenso del inicio del intrón inmediatamente siguiente, el intrón 5, perdiéndose como consecuencia el exón 4.

El exón 4 de *POMT1* contiene 51 nucleótidos que se traducen en 17 aminoácidos, de la glicina 77 a la alanina 93. La delección completa de este exón conservaría la pauta de lectura, dando lugar a una proteína de 708 aminoácidos, en vez de los 725 habituales. El exón 4 se localiza en el “loop” 1 de la proteína *POMT1* (Figura 3, página 42), y se encuentra conservado en todos los organismos eucariotas superiores (Figura 32). Como se observa en la figura, el grado de conservación del exón es bastante extenso, llegando a tener identidad de secuencia aminoacídica hasta roedores (con excepción de *M. musculus* y *R. norvegicus* que se diferencian en un sólo aa). Además, el tamaño del exón se encuentra conservado con exactitud en todos los organismos analizados.

Según estos datos, no es de extrañar por tanto que la mutación que genera la falta de este exón de lugar a WWS, aunque se traduzca en pauta el resto de la proteína.



H. sapiens	GYLGGFDGNFLWNRIGA
P. troglodytes	-----
P. pygmaeus	-----
M. mulatta	-----
B. taurus	-----
E. caballus	-----
C. familiaris	-----
O. anatinus	-----
M. domestica	-----
M. musculus	-W-----
R. norvegicus	-W-----
G. gallus	-----
S. tropicalis	--VAD----M-----
D. rerio	-----V-----
T. nigroviridis	-----YV-----
B. floridae	A-----N---T-E----

Figura 32. Alineamiento del exón 4 de la proteína POMT1. Como puede observarse, este exón se encuentra conservado casi por completo en los vertebrados analizados. La longitud de este exón (17 aa) es, asimismo, idéntica en todos los organismos analizados.

Como ya se explica en el apartado 3.2.2 de “Resultados”, la falta de este exón no debería afectar, en principio, al reconocimiento de la proteína mutada por parte del anticuerpo anti-POMT1 (sp26). Sin embargo, no se detecta la señal esperada por parte de este anticuerpo en los pacientes 5.1 y 6.1 (Figura 26c y 26e), que debería ser similar a la detección con el anticuerpo anti-calnexina (Figura 26d y 26f). Como ya se ha comentado en este mismo apartado, POMT1 se detecta solamente en ciertas regiones de la zona subsarcolémica y en el interior de la célula de forma difuminada en los cortes de tejido muscular de los pacientes 5.1 y 6.1 (Figura 26c y 26e). Esto podría deberse a varios factores: que la proteína POMT1 no se localice de forma adecuada en estos pacientes al encontrarse mutada y faltarle gran parte del “loop” 1, que se encuentre en una conformación que la hiciese más difícil de reconocer por el anticuerpo, o que incluso se encuentre en menor cantidad debido a la degradación de la proteína mutada por parte de las células musculares. La tinción con el anticuerpo anti-calnexina descarta una posible alteración del retículo sarcoplásmico en estos pacientes (Figura 26d y 26f).

No deja de ser notable el hecho de que, a pesar de que los pacientes 5.1 y 6.1 son portadores de las mismas mutaciones, el paciente 6.1 parece haber desarrollado la enfermedad de forma más grave. Revisando la sintomatología descrita para estos pacientes en los apartados 1.5 y 1.6 de “Materiales y Métodos”, se observa la mayor afectación del paciente 6.1, que desde un primer momento muestra un valor de CPK



marcadamente más elevado que el paciente 5.1, anomalías oculares más acusadas y músculo mucho más desestructurado. El paciente 6.1 falleció a los pocos días de vida, mientras que el paciente 5.1 tuvo algunos meses de evolución.

Este fenómeno se ha observado también en otros pacientes que son portadores en homocigosis de una misma mutación en el mismo gen, y sin embargo presentan variabilidad en la severidad del fenotipo desarrollado. Esto ocurre por ejemplo en dos pacientes de CMD con retraso mental sin parentesco que presentan mutación en el gen *POMT2*. En estos pacientes se observa distinto grado de afectación motor, ya que mientras un paciente no adquirió la habilidad de caminar, falleciendo en edad adulta temprana debido a insuficiencia respiratoria, el otro paciente llegó a caminar entre los 2 y 10 años y, aunque sufrió insuficiencia respiratoria, no requirió ventilación mecánica (Yanagisawa *et al.*, 2007). También es interesante destacar otros datos clínicos diferentes entre estos dos pacientes: a) el paciente 1 no presentó afectación ocular, mientras que el paciente 2 presentó pigmentación anómala de la retina periférica; b) el paciente 1 presentó afectación cardíaca consistente en hipertrofia ventricular izquierda, aunque sin mayor desarrollo patológico, mientras que el paciente 2 no presentó afectación cardíaca.

Según estos resultados se deduce que debe haber otros factores responsables de estas diferencias fenotípicas.

2. MUTACIONES ENCONTRADAS EN EL GEN DE LA FUKUTINA

Como se detalla en el apartado 2.2 de “Resultados” se han encontrado mutaciones en el gen de la *fukutina* en dos de las 7 familias analizadas. En estas dos familias, el análisis mutacional del gen *POMT1* no presentó anomalías, lo cual lo excluyó como causante del fenotipo WWS.

2.1. Paciente 3.1

El análisis mutacional en esta paciente reveló dos nuevas mutaciones en el gen de la *fukutina*, ambas en estado de heterocigosis. La primera mutación detectada (c.484G>A, que daría lugar a la sustitución p.Gly125Ser) afecta a un aminoácido que se encuentra



conservado en vertebrados (Figura 19b). Este cambio hidrofílico podría afectar a la estructura y función de la proteína. La paciente 3.1 es heterocigota para este cambio de aminoácido, y como se cita en “Introducción”, hasta hace poco sólo se habían encontrado dos pacientes con mutaciones tipo “nonsense” en estado de homocigosis en el gen de la *fukutina* que desarrollasen WWS (de Bernabe *et al.*, 2003; Sabatelli *et al.*, 2003). Recientemente, se ha descrito un nuevo paciente con diagnóstico de WWS y una mutación en homocigosis en el gen de la *fukutina*. La mutación encontrada en este último paciente también es de tipo “nonsense” (Godfrey *et al.*, 2007). Este tipo de mutaciones darían lugar a una proteína con función nula. Como ya se ha comentado en “Introducción”, aquellos pacientes que son heterocigotos para la inserción del retrotransposón tipo SVA y una mutación puntual en el gen de la *fukutina*, al igual que aquellos que son homocigotos para esta inserción del retrotransposón, desarrollan FCMD (Kondo-Iida *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2001).

El rastreo mutacional del resto de la zona codificante del gen de la *fukutina* resultó infructuoso en la paciente 3.1, por lo que se procedió al análisis de la zona promotora y la región donde se encuentra la señal de poliadenilación del mRNA. En la zona 3' UTR, al final del último exón del gen, se detectó una mutación consistente en una delección de 473 pb, que incluye la señal de poliadenilación de la *fukutina* (Figura 20b). Al examinar detenidamente la secuencia se encontraron dos repeticiones directas cuya secuencia es TTCTAA (señaladas con flechas en la Figura 20b). Es posible que la delección se haya producido por recombinación entre estas repeticiones directas, dando lugar a la pérdida de la secuencia flanqueada por ellas.

La secuencia delecionada, como ya se ha comentado, incluye la señal de poliadenilación del gen de la *fukutina*, necesaria para la correcta adición de adeninas en el extremo 3' del RNA mensajero. El proceso de poliadenilación es esencial para casi todos los mRNAs eucarióticos. Es un proceso complejo que requiere de la participación de múltiples subunidades y secuencias que actúan en cis para la correcta adición del ácido poliadenílico en el extremo 3' del mRNA. La cola de poliA juega un importante papel en cuanto al procesamiento de mRNA en el núcleo, en su exportación al citoplasma, en la estabilidad del mRNA transcrito y en el proceso de traducción. Se han descrito



enfermedades asociadas a mutaciones en la secuencia de poliadenilación (Bennett *et al.*, 2001; Henderson *et al.*, 2006). Por lo tanto, es probable que la mutación detectada en la paciente 3.1 cause una pérdida total del mRNA transcrito desde este alelo, debido a la eliminación de la señal de poliadenilación.

El tamaño predicho para el mRNA transcrito surgido a partir de esta señal de poliadenilación sería de 7,5 kb. Sin embargo, se ha descrito un segundo transcrito minoritario de 6,5 kb, que utiliza una señal de poliadenilación localizada 1 kb delante de la anteriormente mencionada, hacia la zona 5'. Es importante resaltar que la expresión de este RNA transcrito es casi 10 veces menor que la del transcrito de 7,5 kb en cerebro fetal (Sasaki *et al.*, 2000), donde es muy probable que la fukutina juegue un papel fundamental en los procesos de migración neuronal y, por lo tanto, en la correcta formación del cerebro. Según esto, no es presumible que este mRNA minoritario de menor longitud sea capaz de suplir las funciones desarrolladas por el mRNA de 7,5 kb.

Las mutaciones encontradas en la paciente 3.1 no han sido anteriormente descritas en pacientes de WWS, así como tampoco en otras alfa-distroglicanopatías como FCMD, CMDs o LGMDs.

2.2. Familia 4

La mutación encontrada en la familia 4 (c.1660_1668insA, que provoca el cambio p.Phe390IlefsX13, nomenclatura corta p.Phe390fs), es detectada por primera vez en estado de homocigosis en el paciente 4.1. No obstante, esta misma mutación ya había sido encontrada en heterocigosis en otros pacientes. Inicialmente se describió en un paciente diagnosticado de FCMD, en heterocigosis con el retrotransposón tipo SVA. Este paciente fue calificado como un caso grave de FCMD. En el paciente 4.1, la mutación p.Phe390fs se encuentra en estado de homocigosis, y además, se ha comprobado mediante análisis mutacional que ambos padres son portadores de la mutación en heterocigosis, a pesar de no presentar consanguinidad (Figura 21).

Recientemente se ha detectado esta misma mutación en heterocigosis en dos pacientes que han sido diagnosticados con un nuevo tipo de LGMD2 sin anomalías estructurales en el cerebro y con inteligencia normal. Por tanto, parece que cuando esta



mutación tiene lugar en homocigosis en un paciente, da lugar a un fenotipo grave como el WWS. Sin embargo, cuando se encuentra en heterocigosis con mutaciones que se predicen menos graves, el fenotipo desarrollado es más leve, como ocurre en los dos pacientes anteriormente mencionados diagnosticados de LGMD2. De las mutaciones detectadas en estos pacientes en heterocigosis con la mutación p.Phe390fs, una se encuentra en el extremo final de la proteína, eliminando la función de los últimos 6 aminoácidos únicamente, mientras que la otra mutación da lugar a una sustitución p.Arg307Gln, un cambio conservativo que no es probable que sea significativo. De hecho, este mismo tipo de sustitución (p.Arg203Gln) ha sido anteriormente descrita en la fukutina como un polimorfismo sin efecto fenotípico (Kobayashi *et al.*, 2001). Además, estas mutaciones han sido reproducidas mediante mutagénesis dirigida y transfectadas en células CHO, conservando expresión y localización correcta en el aparato de Golgi. Esto indica que las proteínas mutadas podrían retener parte de su actividad. Por ello, se podría concluir que la mutación p.Phe390fs encontrada en paciente 4.1 debe ser grave, ya que da lugar a un fenotipo WWS en homocigosis en el paciente 4.1.

Inicialmente se pensó que este efecto podría ser causado por un fenómeno de decaimiento de mRNA mediado por mutaciones tipo “nonsense” (en inglés, nonsense mediated mRNA decay), ya que la mutación cumplía los requisitos para dar lugar a este efecto. Sin embargo, tras los experimentos detallados en el apartado 4.2 de “Resultados” se ha descartado este fenómeno.

La mutación p.Phe390fs, como ya se ha mencionado, genera la sustitución de los últimos 71 aminoácidos por otros 12 distintos. Esto supone la eliminación completa del último exón de la fukutina, el exón 10, que consta de los últimos 69 aa. Al analizar el grado de conservación de la zona final de la fukutina, comprobamos que este tramo final se encuentra muy conservado. En la Figura 33a se expone el alineamiento del tramo final de la fukutina en distintas especies, a partir de la Tyr267 humana. En esta Figura se observa un alto grado de conservación incluso desde metazoos primitivos.



(a)

H. sapiens	humano	TVEAVAFRKSARELLQAAKTLNKLGVFPFMLS
C. familiaris	perro	TVEAMAFRKNARELLQAAKTLKGLVQFMLS
E. caballus	caballo	TVEAVAFRKSARELLQAAKTLKGLVRFMLS
B. taurus	vaca	TVEAMTFQRKARELLQAAKTLKGLVRFMLS
M. musculus	ratón	TVEAMTFQRKARELLQAAKTLKGLVRFMLS
M. domestica	zargarigüeya	TVEAMTFQRKARELLQAAKTLKGLVRFMLS
O. anatinus	ornitorrinco	TVEAMTFQRKARELLQAAKTLKGLVRFMLS
G. gallus	pollo	TVEAMTFQRKARELLQAAKTLKGLVRFMLS
A. carolinensis	camaleón	TVEAMTFQRKARELLQAAKTLKGLVRFMLS
X. tropicalis	rana xenopus	TVEAMTFQRKARELLQAAKTLKGLVRFMLS
D. rerio	pez cebra	TVEAMTFQRKARELLQAAKTLKGLVRFMLS
T. rubripes	pez globo	TVEAMTFQRKARELLQAAKTLKGLVRFMLS
B. floridae	anfioso	TVEAMTFQRKARELLQAAKTLKGLVRFMLS
M. tectiformis	ascidia	TVEAMTFQRKARELLQAAKTLKGLVRFMLS
S. purpuratus	erizo mar	TVEAMTFQRKARELLQAAKTLKGLVRFMLS
C. capitata	anélido	TVEAMTFQRKARELLQAAKTLKGLVRFMLS
I. gigantea	lapa	TVEAMTFQRKARELLQAAKTLKGLVRFMLS
T. adhaerens	placozoo	TVEAMTFQRKARELLQAAKTLKGLVRFMLS

Dominio LicD

H. sapiens	humano	GKRFKYLFPKFTLCWTEFVDMKLVHVPCTELEY	461
C. familiaris	perro	GKRFKYLFPKFTLCWTEFVDMKLVHVPCTELEY	461
E. caballus	caballo	GKRFKYLFPKFTLCWTEFVDMKLVHVPCTELEY	461
B. taurus	vaca	GKRFKYLFPKFTLCWTEFVDMKLVHVPCTELEY	461
M. musculus	ratón	GKRFKYLFPKFTLCWTEFVDMKLVHVPCTELEY	461
M. domestica	zargarigüeya	GKRFKYLFPKFTLCWTEFVDMKLVHVPCTELEY	461
O. anatinus	ornitorrinco	GKRFKYLFPKFTLCWTEFVDMKLVHVPCTELEY	461
G. gallus	pollo	GKRFKYLFPKFTLCWTEFVDMKLVHVPCTELEY	461
A. carolinensis	camaleón	GKRFKYLFPKFTLCWTEFVDMKLVHVPCTELEY	461
X. tropicalis	rana xenopus	GKRFKYLFPKFTLCWTEFVDMKLVHVPCTELEY	461
D. rerio	pez cebra	GKRFKYLFPKFTLCWTEFVDMKLVHVPCTELEY	461
T. rubripes	pez globo	GKRFKYLFPKFTLCWTEFVDMKLVHVPCTELEY	461
B. floridae	anfioso	GKRFKYLFPKFTLCWTEFVDMKLVHVPCTELEY	461
M. tectiformis	ascidia	GKRFKYLFPKFTLCWTEFVDMKLVHVPCTELEY	461
S. purpuratus	erizo mar	GKRFKYLFPKFTLCWTEFVDMKLVHVPCTELEY	461
C. capitata	anélido	GKRFKYLFPKFTLCWTEFVDMKLVHVPCTELEY	461
I. gigantea	lapa	GKRFKYLFPKFTLCWTEFVDMKLVHVPCTELEY	461
T. adhaerens	placozoo	GKRFKYLFPKFTLCWTEFVDMKLVHVPCTELEY	461

(b)

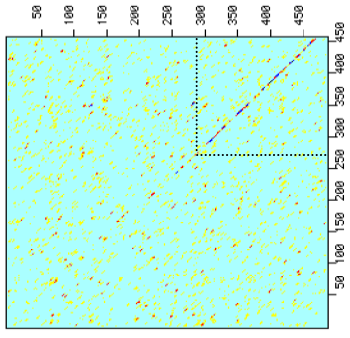


Figura 33. Conservación de secuencia de la parte final de las fukutinas en distintas especies. (a) Alineamiento múltiple de diferentes fukutinas realizado con el programa “T-Coffee” en el servidor del EBI (European Bioinformatics Institute). La parte final de la secuencia de la fukutina está muy conservada entre especies. En dicha secuencia conservada se encuentra el dominio LicD, que se indica con un recuadro azul. La raya roja indica la secuencia que se pierde en el paciente 4.1 al tener lugar la inserción c.1660_1668insA. (b) A la derecha, matriz de puntos entre las secuencias finales de las fukutinas humana (eje x) y de ascidia (eje y). Se indica marcado las secuencias finales de ambas fukutinas que están representadas en el alineamiento múltiple. *, aminoácidos idénticos; : aminoácidos conservados; . aminoácidos semiconservados.



Es significativo el hecho de que este último tramo contiene el dominio LicD. Este dominio, como ya se comenta en “Introducción”, está implicado en el metabolismo de la fosforilcolina, por lo que podría estar implicado en la posible función de la fukutina, aún desconocida. Además, este tramo final (que incluye el exón 10) es el más conservado dentro de la estructura aminoacídica de la proteína después del dominio LicD. En la Figura 33b se muestra la matriz de puntos resultante de realizar la comparación entre la fukutina humana y la de la ascidia, en la cual se observa que el último tercio de la proteína se encuentra muy conservado a pesar de la distancia evolutiva existente entre estas especies.

Todos estos datos parecen indicar la gran importancia de este tramo final de la proteína, en el cual podría residir su dominio catalítico. Por ello, postulamos que, a pesar de que la mutación p.Phe390fs se encuentra en la parte final de la fukutina, afecta de forma muy significativa a la misma. Proponemos que la mutación p.Phe390fs daría lugar a una proteína fukutina con una función muy limitada o casi nula.

3. EFECTO DE LAS MUTACIONES DETECTADAS EN LAS FAMILIAS SOBRE EL DISTROGLICANO

El estudio del α -dístroglicano, proteína cuya hipoglicosilación es característica del WWS, no se ha podido realizar en las familias 1, 2 y en la paciente 3.1 debido a falta de material a analizar. En las familias restantes, sin embargo, se ha realizado el estudio obteniéndose resultados concordantes con lo esperado.

3.1. Hipoglicosilación del α -DG en la familia 4

En la familia 4, portadora de la mutación p. Phe390fs, el estudio se ha realizado en las líneas celulares procedentes del *Coriell Institute*, por carecer de otro material del enfermo o de sus padres. Estas líneas celulares proceden de linfoblastos. La sangre es un tejido que carece de una matriz sólida. En este tipo de tejido una alfa-dístroglicanopatía no se manifiesta, al menos de forma patológica. Aun así, se han realizado estudios en estas células que amplían nuestra visión de la enfermedad.



En la Figura 29 se muestra el resultado del ensayo de Western blot con el anticuerpo VIA-4 realizado con extracto de proteína total aislado del medio de cultivo de las células. En el extracto de proteína perteneciente a medio de cultivo de células C2C12 puede observarse una amplia señal, mientras que en correspondiente a células GM10182 (pertenecientes al padre 4.3) la señal es mucho menor. Esto nos indica que la glicosilación del α -DG es escasa en linfoblastos. Esto puede deberse a que estas células pertenecen a un tejido de matriz no sólida, donde es probable que el α -DG no desempeñe funciones tan importantes como en otros tejidos (por ejemplo el muscular). En el carril que corresponde a las células GM10180 no se detecta señal, indicándonos que en estas células la glicosilación del α -DG no tiene lugar de forma adecuada. Esto impide su precipitación del medio de cultivo mediante WGA y por lo tanto su detección con el anticuerpo VIA-4.

3.1.1. Pérdida de localización en membrana del α -DG en linfoblastos inmortalizados de los miembros de la familia 4

Como se detalla en “Resultados”, las células de la línea GM10180 transfectadas con la construcción A del DG muestran una correcta localización del β -DG en la membrana, mientras que el α -DG se localizaba en una zona perinuclear (Figuras 30a y 31a). A la luz de estos resultados se postulan dos razones por las cuales podría estar ocurriendo este suceso: que la fukutina mutada impidiese la correcta glicosilación del α -DG, quedando éste retenido durante la modificación post-traducciona, o bien que la fukutina realice alguna función de ayuda respecto a la migración del DG a la membrana. Lo que se observa en estos resultados es que el α -DG sobreexpresado se queda estancado en algún paso del procesamiento y/o migración hacia la membrana celular, localizándose por lo tanto en orgánulos que se encuentran alrededor del núcleo.

Por otra parte, estos resultados parecen confirmar que el α -DG sufre procesamientos post-traduccionales en linfoblastos, que la fukutina juega un papel en este procesado y que la falta de función de ésta impide al α -DG alcanzar su correcta localización en la membrana celular.



No pudo realizarse Western blot de estas transfecciones ya que la cantidad de células transfectadas era demasiado limitada para este procedimiento.

Este mismo experimento se realizó en células SH-SY5Y, aunque los resultados no han sido concluyentes, ya que ninguna de las construcciones se localizó en la membrana celular (datos no mostrados). Puede ser que, dependiendo de tipo celular, el funcionamiento del PPT-LS o la propia señal de membrana del DG sean más o menos efectivos. Parece ser que el promotor CMV presente en el plásmido pFLAG-CMV-3 no funciona de forma óptima en tipos celulares neuronales, por lo que esta podría haber sido la causa de la falta de obtención de resultados en estos experimentos.

3.2. Hipoglicosilación del α -DG en los pacientes 5.1 y 6.1

En los pacientes 5.1 y 6.1, portadores de las dos mismas mutaciones homocigotas en POMT1 (p.Ser515Arg y p.Gly77_Ala93del), la distroglicanopatía se observa con mayor claridad. En la Figura 23b y 23c se observa una ausencia de señal en las inmunotinciones realizadas con el anticuerpo VIA-4 en estos dos pacientes. Sin embargo, con el anticuerpo α DAG (Figura 24c y 24d) se puede observar cómo la parte proteica del α -DG no se ve afectada por la falta de glicosilación, mostrando una correcta localización en la membrana sarcoplásmica. Incluso puede observarse en zonas interiores de la célula, probablemente en proceso de modificación post-traducciona.

3.3. Hipoglicosilación del α -DG en el paciente 7.1

En el paciente 7.1, como ya se ha indicado en “Resultados”, no se han encontrado mutaciones en los genes *POMT1* o *fukutina*, únicos analizados hasta el momento de finalización del trabajo de investigación para la presente tesis doctoral. Sin embargo, los datos obtenidos de los estudios inmunohistoquímicos, demuestran que el paciente 7.1 padece una α -distroglicanopatía, ya que al igual que los paciente 5.1 y 6.1, presenta ausencia de señal con el anticuerpo VIA-4 (Figura 23d). El anticuerpo α DAG da lugar a la misma señal interior y en membrana que la observada para los pacientes 5.1 y 6.1 (Figura 24d). Actualmente se está llevando a cabo el rastreo mutacional del material



genético de esta familia en otros genes candidatos, con el fin de encontrar el gen responsable de la enfermedad.

3.4. El β -DG no está afectado en los pacientes de WWS

El β -DG no se ve afectado en ninguno de estos pacientes. Esto puede observarse en las Figuras 28 y 30 para el paciente 4.1, y en la Figura 25b, 25c y 25d para los pacientes 5.1, 6.1 y 7.1 respectivamente.

4. POSIBLES EFECTOS FUNDADORES

Se ha constatado en algunos grupos étnicos con un porcentaje de consanguinidad elevado, efectos fundadores de mutaciones en algunos de los genes causantes de las alfa-distroglicanopatías. El caso más conocido es el de la prevalencia en la población finlandesa de enfermos de MEB. Esta abundancia de casos permitió identificar una mutación con efecto fundador y al gen *POMGnT1* como responsable de la citada enfermedad (Taniguchi *et al.*, 2003). Otro caso con gran prevalencia es la abundancia de enfermos de FCMD entre la población japonesa, y la inexistencia de los mismos fuera de Japón. Como ya se describe en “Introducción”, se determinó que la causa de esta enfermedad era la inserción de un retrotransposón tipo SVA en la zona final del gen de la *fukutina*, y que la alta incidencia de esta enfermedad se debía al efecto fundador de esta inserción en la población japonesa.

Efectos fundadores de menor alcance se han descrito en otros genes causantes de alfa-distroglicanopatías, incluso en familias en las que no se reporta consanguinidad. Un ejemplo de esto ocurre en cuatro familias de origen francés y marroquí sin parentesco, en las que se ha encontrado la misma mutación en el gen *POMT2* (Yanagisawa *et al.*, 2007). Asimismo, se ha encontrado la misma inserción consistente en una secuencia tipo *Alu* en el gen *POMT1*, en otras tres familias francesas en las que los individuos afectados se han diagnosticado como WWS (Bouchet *et al.*, 2007b).

En el presente estudio se postulan dos posibles efectos fundadores de mutaciones. El primero se describe en dos familias de origen gitano con mutaciones en el gen *POMT1* y el segundo en el gen de la *fukutina* en una familia de origen judío.



4.1. Efecto fundador de mutaciones en el gen *POMT1* en la población de etnia gitana española

Como se describe en el apartado 2.1.3 de “Resultados”, las mutaciones halladas en *POMT1* c.1724C>G y g.3545 G>T que se traducen en p.Ser515Arg y p.Gly77_Ala93del respectivamente, han sido halladas en homocigosis en dos individuos de etnia gitana sin parentesco manifestado. Los pacientes 5.1 y 6.1 provenían de familias con un alto grado de consanguinidad, por lo que es muy probable que estas mutaciones se encontrasen en estado de heterocigosis en los dos progenitores de ambos pacientes. La consanguinidad es frecuente entre las poblaciones de etnia gitana, de lo cual se deriva la manifestación de fenotipos causados por mutaciones de carácter recesivo, la transmisión de estas mutaciones y la elevada frecuencia de enfermos. Sin embargo, no nos ha sido posible continuar con los estudios que hubiesen sido necesarios en esta población para la confirmación de este posible efecto fundador. Por otra parte, los datos almacenados de importancia diagnóstica sobre los enfermos suelen ser escasos, y proceden únicamente de visitas esporádicas de las madres a la consulta hospitalaria. Todo esto ha dificultado la realización de un estudio más amplio.

4.2. Efecto fundador de una mutación en el gen de la *fukutina* en la población judía

Como se describe en el apartado 2.2 de la presente “Discusión”, la mutación p.Phe390fs encontrada en el paciente 4.1 ya había sido hallada anteriormente en enfermos afectados de otras patologías, cuyo denominador común es la alteración de la glicosilación del α -DG. En todos estos enfermos, la mutación aquí citada se ha encontrado en heterocigosis, siendo este hecho responsable de que estos otros enfermos hayan desarrollado una enfermedad de carácter más leve que el WWS.

Analizando el origen de algunos de los pacientes que comparten esta mutación en estado de heterocigosis, se descubre que de los dos pacientes con diagnóstico de LGMD2, portadores de la mutación p.Phe390fs en heterocigosis, uno tiene un progenitor de origen judío, y los padres del otro son de origen israelí (siendo altamente probable que sean de origen judío por su procedencia). Los padres del paciente 4.1 del presente trabajo, como



ya ha sido anteriormente citado en “Materiales y Métodos” son también de origen judío. Por ello, se postula que podría existir un posible efecto fundador de esta mutación en la población judía. Tanto la familia del enfermo afectado de LGMD2, como el paciente 4.1, proceden de familias que se declaran no consanguíneas. Sin embargo, el efecto fundador puede haberse producido en un periodo de tiempo anterior y haberse transmitido de forma silenciosa a las generaciones actuales.

Este efecto fundador no se extiende, sin embargo, al primer paciente en el cual se describió la mutación p.Phe390fs. En este paciente, portador de la mutación en heterocigosis con el retrotransposón tipo SVA, no se encontró la mutación en ninguno de los padres, por lo que se especuló que pudo producirse “*de novo*”. La región c.1660_1667, que consta de 7 adeninas al final del exón 9 del gen de la *fukutina*, podría ser un sitio caliente de mutación.

5. RELEVANCIA DEL GEN DE LA *FUKUTINA* EN EL WWS

Los primeros trabajos que revelaron pacientes con diagnóstico clínico de WWS y con mutaciones en el gen de la *fukutina* en ambos alelos aparecieron simultáneamente en el año 2003 (de Bernabe et al., 2003; Silan et al., 2003), como ya se ha mencionado en diversas ocasiones. Sin embargo, y a pesar de esta coincidencia, no se volvieron a describir más enfermos de WWS con mutaciones en el gen de la *fukutina* hasta muy recientemente. A mediados del año 2007 se realizó un amplio estudio que incluía 92 pacientes con alfa-distroglicanopatías, 5 de los cuales fueron clasificados como WWS por la gravedad de sus síntomas. De entre estos últimos, en uno de ellos se ha encontrado una mutación de tipo “nonsense” en homocigosis en el gen de la *fukutina* responsable de fenotipo WWS (Godfrey *et al.*, 2007). Los dos casos descritos en el presente trabajo son dos ejemplos más de WWS causado por mutaciones en el gen de la *fukutina*, lo cual excluye a este gen como causa esporádica de este síndrome, ya que el porcentaje de casos es sustancialmente mayor que aquellos casos de WWS causado por mutaciones en el resto de los genes causales como *FKRP* o *LARGE*.



No se han descrito más casos aparte del trabajo aquí presentado, lo cual hace suponer que mutaciones en el gen de la *fukutina* dan lugar a un fenotipo tan severo que es incompatible con la vida.

El gen de la *fukutina*, como se ha comentado previamente en “Introducción”, presenta también una amplia variabilidad en cuanto a la gravedad de las enfermedades resultantes de las mutaciones que se originan en él (Godfrey et al., 2006; Murakami et al., 2006; Godfrey et al., 2007). Sin embargo, parece que aparte de los pacientes que han desarrollado WWS o FCMD, el resto de pacientes con mutaciones en el gen de la *fukutina* carecen de anomalías cerebrales y gozan de inteligencia normal.

6. EFECTOS FENOTÍPICOS ANÓMALOS EN PACIENTES CON MUTACIONES EN LOS GENES DE LA *FUKUTINA* O *FKRP*

La paciente 3.1 del presente trabajo, diagnosticada como WWS, presenta una serie de anomalías cardíacas que parecen no concordar con la sintomatología típica del WWS. Ciertamente, las anomalías cardíacas no son un síntoma prevalente en esta patología, y no suelen ofrecerse datos de exámenes cardíacos realizados a los pacientes de WWS. Sin embargo, revisando la literatura encontramos que en uno de los paciente de WWS con mutación de tipo “nonsense” en el gen de la *fukutina* se muestra una elevación de la CPK miocárdica (CPK3, creatina quinasa de unión al miocardio) (Silan *et al.*, 2003). Este dato podría ser interpretado como un signo de daño cardíaco. En la descripción de la FCMD que se detalla en el OMIM, la fibrosis miocárdica está mencionada como un síntoma general. Recientemente se han descrito seis pacientes con mutaciones en el gen de la *fukutina* (portadores de la inserción del retrotransposón tipo SVA en heterocigosis con mutaciones de carácter muy leve), cuyos únicos síntomas se describían como cardiomiopatías dilatadas con leve debilidad muscular e inteligencia normal (Murakami *et al.*, 2006a).

La *fukutina* y la *FKRP* son proteínas homólogas, por lo cual podrían desempeñar funciones similares. No es de extrañar, por tanto, que las enfermedades a las que dan lugar sus mutaciones tengan síntomas en común. Los enfermos de MDC1C con mutaciones en



el gen de la *FKRP* suelen presentar elevación de la CPK y pérdida de ambulación en la adolescencia temprana seguida del desarrollo de cardiomiopatía.

No es de extrañar, a la vista de estos datos, que los pacientes que presentan mutaciones en el gen de la *fukutina* presenten algún tipo de afectación cardiaca, independientemente de la gravedad de su fenotipo. Teniendo en cuenta estos datos, en conjunción con el hecho de que todas estas patologías afectan al músculo, es razonable pensar que el músculo cardiaco se vea afectado.

7. HETEROGENEIDAD GENÉTICA Y HETEROGENEIDAD FENOTÍPICA

En términos de alfa-distroglicanopatías, el mismo gen puede dar lugar a varias patologías, y la misma patología puede venir causada por varios genes. Podría hablarse de un complejo multimérico. Se ha demostrado interacción entre POMT1 y POMT2, entre *fukutina* y distroglicano y entre POMGnT1 y *fukutina* (Akasaka-Manyá *et al.*, 2004; Manyá *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2006). Quizá no todos ellos afecten por igual en todos los niveles. Parece establecido que POMT1 y POMT2 juegan un papel fundamental durante la formación del cerebro, ya que hasta ahora casi todos los pacientes con mutaciones en alguno de estos dos genes han presentado al menos retraso mental y leves alteraciones estructurales en cerebro. La *fukutina* y la *FKRP* parecen tener una relevancia mayor a nivel de músculo cardiaco, ya que estos pacientes parecen presentar cardiomiopatías. Y todos ellos juegan un importante papel a nivel muscular, ya que en todos se presenta distrofia muscular, que puede ser o no congénita, pero que en los pacientes va empeorando con la edad.

A pesar de la amplia variedad de genes que se han caracterizado como causantes del WWS y de otras enfermedades relacionadas, sigue existiendo un amplio porcentaje de pacientes en los cuales aun no se ha encontrado mutación. La razón de este suceso puede ser que las mutaciones causantes de las enfermedades se encuentren en zonas de los genes conocidos que no hayan sido secuenciadas ni analizadas por otros métodos, o bien porque se encuentren en otros genes distintos a los descritos. La búsqueda de genes causantes de estas enfermedades continúa, también por nuestra parte.



Una manera de ampliar el abanico de genes candidatos fueron los ensayos de doble híbrido en levaduras. Parecía razonable pensar que aquellas proteínas que interaccionasen con POMT1 podrían ser candidatas a ser causantes de WWS o, al menos, de una patología relacionada. De esta manera se identificaron las proteínas FAM48A, CRYAB, COX11, DNAJB6, DNAJB11 y HNAC1. De entre estas opciones eligieron los genes *DNAJB6*, *DNAJB11* y *CRYAB* para comenzar el análisis mutacional. Los resultados de la secuenciación estos genes fueron negativos para todos los pacientes analizados (Familias 1, 2, 4 y paciente 3, datos no mostrados). Esto no excluye la posibilidad de que sean causantes de algunos casos de alfa-distroglucanopatías que quedan por caracterizar, ya que en nuestro caso, en todos los pacientes (a excepción de la familia 7) han sido halladas mutaciones en alguno de los genes conocidos.

Con objeto de continuar con la investigación de las bases del WWS y de patologías relacionadas, nos hemos puesto en contacto con diversos hospitales, cuya colaboración es fundamental para seguir con el desarrollo de esta investigación.

Conclusiones



1. El gen *POMT1* sigue siendo la causa principal del WWS. Este gen es responsable de un 25% de los casos de este síndrome. Los datos obtenidos en este trabajo, aunque muestran un porcentaje mayor, concuerdan con esta prevalencia de *POMT1* como causante del WWS.
2. El gen de la *fukutina* no parece ser una causa esporádica de este síndrome. Nuestro estudio corrobora y pone de manifiesto la relevancia de este gen como causa de WWS, probablemente debido a defectos en la glicosilación del α -DG.
3. Los enfermos con mutación en el gen *POMT1* sufren hipoglicosilación del α -DG, aunque la localización de esta proteína en la membrana plasmática no se ve afectada. Esto implica que la glicosilación no es fundamental para la correcta migración del distroglicano a la membrana celular.
4. El péptido señal propio del distroglicano parece ser relevante en la correcta migración del α -DG y del β -DG a la membrana en linfoblastos, observándose una distribución citoplásmica de estas dos proteínas cuando se transcriben a partir de otro péptido señal.
5. La mutación p.Phe390fs descrita en el paciente 4.1 en el gen de la *fukutina* parece afectar a la correcta localización del α -DG en la membrana plasmática. El α -DG en células de este paciente se localiza en una zona perinuclear y no en la membrana plasmática. Esto podría explicar la gravedad del fenotipo observado en este paciente.
6. Existe un posible efecto fundador del gen *POMT1* en la población de etnia gitana española. En dos familias no consanguíneas de origen gitano se han encontrado las mismas dos mutaciones en homocigosis en el gen *POMT1*, indicando que ese tramo se ha heredado ligado en esta población.
7. Parece existir también un efecto fundador del gen de la *fukutina* en la población judía, ya que varias familias de origen judío comparten la mutación p.Phe390fs. Esta misma mutación ha sido, sin embargo, hallada en un paciente de probable origen japonés, en el cual se ha producido “de novo”. No se descarta por tanto que esta zona pueda ser un sitio caliente de mutación en el gen de la *fukutina*.



8. La mutación que genera la pérdida del exón 4 en los pacientes 5.1 y 6.1, da lugar a fallos en la detección de la proteína POMT1 en tejido de estos pacientes, a pesar de conservar la pauta de lectura y de no pertenecer a la zona de reconocimiento del anticuerpo. Este exón ha resultado estar altamente conservado en la evolución, llegando este grado de conservación incluso hasta su longitud en secuencia de nucleótidos y por lo tanto de aminoácidos. Este hecho puede indicar la importancia de esta secuencia en la función de la proteína.
9. La mutación p.Phe390fs da lugar a un fenotipo WWS en homocigosis, a pesar de implicar solamente el último exón del gen de la *fukutina*. Su secuencia codificante, así como la secuencia próxima que comprende el tercio final de la proteína, se encuentra ampliamente conservada. Dentro de esta región, se encuentra un dominio especialmente conservado, el dominio LicD, que podría indicar otras funciones para la fukutina distintas de las de glicosiltransferasa, como se había postulado previamente.
10. Se han encontrado mutaciones en el 100 % de las familias analizadas en este trabajo descritas como casos típicos de WWS. Las mutaciones encontradas pertenecen a los genes actualmente descritos como causantes mayoritarios de esta patología. Sin embargo, en la bibliografía solamente se han encontrado mutaciones en estos genes en el 30 % de los pacientes de WWS. La búsqueda de genes causantes de esta patología ha de continuar con el fin de determinar todas las causas que pueden dar origen a esta grave enfermedad.

Bibliografía



- Akasaka-Manyu K, Manyu H, Endo T (2004) Mutations of the POMT1 gene found in patients with Walker-Warburg syndrome lead to a defect of protein O-mannosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 75-9
- Aravind L, Koonin EV (1999) The fukutin protein family--predicted enzymes modifying cell-surface molecules. *Curr Biol* 9: R836-7
- Balci B, Uyanik G, Dincer P, Gross C, Willer T, Talim B, Haliloglu G, Kale G, Hehr U, Winkler J, Topaloglu H (2005) 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* 15: 271-5
- Barresi R, Campbell KP (2006) Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci* 119: 199-207
- 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 KP (2004) LARGE can functionally bypass alpha-dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. *Nat Med* 10: 696-703
- Beltran-Valero de Bernabe D, Currier S, Steinbrecher A, Celli J, van Beusekom E, van der Zwaag B, Kayserili H, Merlini L, Chitayat D, Dobyns WB, Cormand B, Lehesjoki AE, Cruces J, Voit T, Walsh CA, van Bokhoven H, Brunner HG (2002) Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet* 71: 1033-43
- Beltran-Valero de Bernabe D, Voit T, Longman C, Steinbrecher A, Straub V, Yuva Y, Herrmann R, Sperner J, Korenke C, Diesen C, Dobyns WB, Brunner HG, van Bokhoven H, Brockington M, Muntoni F (2004) Mutations in the FKR1 gene can cause muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet* 41: e61
- Bennett CL, Brunkow ME, Ramsdell F, O'Briant KC, Zhu Q, Fuleihan RL, Shigeoka AO, Ochs HD, Chance PF (2001) A rare polyadenylation signal mutation of the FOXP3 gene (AAUAAA-->AAUGAA) leads to the IPEX syndrome. *Immunogenetics* 53: 435-9
- 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 (2007) POMT2 gene mutation in limb-girdle muscular dystrophy with inflammatory changes. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 1033-7
- Bouchet C, Gonzales M, Vuillaumier-Barrot S, Devisme L, Lebizec C, Alanio E, Bazin A, Bessieres-Grattagliano B, Bigi N, Blanchet P, Bonneau D, Bonnieres M, Carles D, Delahaye S, Fallet-Bianco C, Figarella-Branger D, Gaillard D, Gasser B, Guimiot F, Joubert M, Laurent N, Liprandi A, Loget P, Marcorelles P, Martinovic J, Menez F, Patrier S, Pelluard-Nehme F, Perez MJ, Rouleau-Dubois C, Triau S, Laquerriere A, Encha-Razavi F, Seta N (2007a) Molecular heterogeneity in fetal forms of type II lissencephaly. *Hum Mutat* 28: 1020-7
- Bouchet C, Vuillaumier-Barrot S, Gonzales M, Boukari S, Bizec CL, Fallet C, Delezoide AL, Moiro H, Laquerriere A, Encha-Razavi F, Durand G, Seta N (2007b) Detection of an Alu insertion in the POMT1 gene from three French Walker Warburg syndrome families. *Mol Genet Metab* 90: 93-6
- 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 (2001a) 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* 69: 1198-209



- 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 (2001b) 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* 10: 2851-9
- Cohn RD (2005) Dystroglycan: important player in skeletal muscle and beyond. *Neuromuscul Disord* 15: 207-17
- Cohn RD, Campbell KP (2000) Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 23: 1456-71
- Cohn RD, Henry MD, Michele DE, Barresi R, Saito F, Moore SA, Flanagan JD, Skwarchuk MW, Robbins ME, Mendell JR, Williamson RA, Campbell KP (2002) Disruption of DAG1 in differentiated skeletal muscle reveals a role for dystroglycan in muscle regeneration. *Cell* 110: 639-48
- Cormand B, Pihko H, Bayes M, Valanne L, Santavuori P, Talim B, Gershoni-Baruch R, Ahmad A, van Bokhoven H, Brunner HG, Voit T, Topaloglu H, Dobyns WB, Lehesjoki AE (2001) Clinical and genetic distinction between Walker-Warburg syndrome and muscle-eye-brain disease. *Neurology* 56: 1059-69
- Cotarelo RP, Valero MC, Prados B, Pena A, Rodriguez L, Fano O, Marco JJ, Martinez-Frias ML, Cruces J (2008) Two new patients bearing mutations in the fukutin gene confirm the relevance of this gene in Walker-Warburg syndrome. *Clin Genet* 73: 139-45
- 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 (2005) Mutations in POMT1 are found in a minority of patients with Walker-Warburg syndrome. *Am J Med Genet A* 133: 53-7
- Chiba A, Matsumura K, Yamada H, Inazu T, Shimizu T, Kusunoki S, Kanazawa I, Kobata A, Endo T (1997) 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* 272: 2156-62
- D'Amico A, Tessa A, Bruno C, Petrini S, Biancheri R, Pane M, Pedemonte M, Ricci E, Falace A, Rossi A, Mercuri E, Santorelli FM, Bertini E (2006) Expanding the clinical spectrum of POMT1 phenotype. *Neurology* 66: 1564-7; discussion 1461
- de Bernabe 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 (2003) A homozygous nonsense mutation in the fukutin gene causes a Walker-Warburg syndrome phenotype. *J Med Genet* 40: 845-8
- Endo T (2004) Structure, function and pathology of O-mannosyl glycans. *Glycoconj J* 21: 3-7
- Finne J, Krusius T, Margolis RK, Margolis RU (1979) Novel mannitol-containing oligosaccharides obtained by mild alkaline borohydride treatment of a chondroitin sulfate proteoglycan from brain. *J Biol Chem* 254: 10295-300
- Fujimura K, Sawaki H, Sakai T, Hiruma T, Nakanishi N, Sato T, Ohkura T, Narimatsu H (2005) LARGE2 facilitates the maturation of alpha-dystroglycan more effectively than LARGE. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 1162-71
- Garvey SM, Rajan C, Lerner AP, Frankel WN, Cox GA (2002) The muscular dystrophy with myositis (mdm) mouse mutation disrupts a skeletal muscle-specific domain of titin. *Genomics* 79: 146-9
- 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 (2007) Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain*
- 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 (2006a) Fukutin gene mutations in steroid-responsive limb girdle muscular dystrophy. *Ann Neurol* 60: 603-10
- 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 (2006b) Fukutin gene mutations in steroid-responsive limb girdle muscular dystrophy. *Ann Neurol*
- Grewal PK, Holzfeind PJ, Bittner RE, Hewitt JE (2001) Mutant glycosyltransferase and altered glycosylation of alpha-dystroglycan in the myodystrophy mouse. *Nat Genet* 28: 151-4
- Hayashi YK, Ogawa M, Tagawa K, Noguchi S, Ishihara T, Nonaka I, Arahata K (2001) Selective deficiency of alpha-dystroglycan in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Neurology* 57: 115-21
- Henderson S, Chapple M, Rugless M, Fisher C, Kinsey S, Old J (2006) Haemoglobin H hydrops fetalis syndrome associated with homozygosity for the alpha2-globin gene polyadenylation signal mutation AATAAA-->AATA. *Br J Haematol*
- Jurado LA, Coloma A, Cruces J (1999) 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* 58: 171-80
- Kobayashi K, Sasaki J, Kondo-Iida E, Fukuda Y, Kinoshita M, Sunada Y, Nakamura Y, Toda T (2001) Structural organization, complete genomic sequences and mutational analyses of the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy gene, fukutin. *FEBS Lett* 489: 192-6
- Kondo-Iida E, Kobayashi K, Watanabe M, Sasaki J, Kumagai T, Koide H, Saito K, Osawa M, Nakamura Y, Toda T (1999) Novel mutations and genotype-phenotype relationships in 107 families with Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Mol Genet* 8: 2303-9
- Longman C, Brockington M, Torelli S, Jimenez-Mallebrera C, Kennedy C, Khalil N, Feng L, Saran RK, Voit T, Merlini L, Sewry CA, Brown SC, Muntoni F (2003) 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* 12: 2853-61
- Manya H, Bouchet C, Yanagisawa A, Vuillaumier-Barrot S, Quijano-Roy S, Suzuki Y, Maugendre S, Richard P, Inazu T, Merlini L, Romero NB, Leturcq F, Bezier I, Topaloglu H, Estournet B, Seta N, Endo T, Guicheney P (2007) Protein O-mannosyltransferase activities in lymphoblasts from patients with alpha-dystroglycanopathies. *Neuromuscul Disord*
- Manya H, Chiba A, Yoshida A, Wang X, Chiba Y, Jigami Y, Margolis RU, Endo T (2004) Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 500-5
- Martin-Blanco E, Garcia-Bellido A (1996) Mutations in the rotated abdomen locus affect muscle development and reveal an intrinsic asymmetry in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6048-52



- Mercuri E, D'Amico A, Tessa A, Berardinelli A, Pane M, Messina S, van Reeuwijk J, Bertini E, Muntoni F, Santorelli FM (2006) POMT2 mutation in a patient with 'MEB-like' phenotype. *Neuromuscul Disord* 16: 446-8
- Moore SA, Saito F, Chen J, Michele DE, Henry MD, Messing A, Cohn RD, Ross-Barta SE, Westra S, Williamson RA, Hoshi T, Campbell KP (2002) Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Nature* 418: 422-5
- Muller-Seitz M, Kaupmann K, Labeit S, Jockusch H (1993) Chromosomal localization of the mouse titin gene and its relation to "muscular dystrophy with myositis" and nebulin genes on chromosome 2. *Genomics* 18: 559-61
- Muntoni F, Voit T (2004) The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress. *Neuromuscul Disord* 14: 635-49
- Murakami T, Hayashi YK, Noguchi S, Ogawa M, Nonaka I, Tanabe Y, Ogino M, Takada F, Eriguchi M, Kotooka N, Campbell KP, Osawa M, Nishino I (2006a) Fukutin gene mutations cause dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness. *Ann Neurol* 60: 597-602
- Murakami T, Hayashi YK, Noguchi S, Ogawa M, Nonaka I, Tanabe Y, Ogino M, Takada F, Eriguchi M, Kotooka N, Campbell KP, Osawa M, Nishino I (2006b) Fukutin gene mutations cause dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness. *Ann Neurol*
- Peyrard M, Seroussi E, Sandberg-Nordqvist AC, Xie YG, Han FY, Fransson I, Collins J, Dunham I, Kost-Alimova M, Imreh S, Dumanski JP (1999) The human LARGE gene from 22q12.3-q13.1 is a new, distinct member of the glycosyltransferase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 598-603
- Prados B, Pena A, Cotarelo RP, Valero MC, Cruces J (2007) 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* 170: 1659-68
- Ren Z, Riley NJ, Needleman LA, Sanders JM, Swanson GT, Marshall J (2003) Cell surface expression of GluR5 kainate receptors is regulated by an endoplasmic reticulum retention signal. *J Biol Chem* 278: 52700-9
- Ruttledge MH, Xie YG, Han FY, Peyrard M, Collins VP, Nordenskjold M, Dumanski JP (1994) Deletions on chromosome 22 in sporadic meningioma. *Genes Chromosomes Cancer* 10: 122-30
- Sabatelli P, Columbaro M, Mura I, Capanni C, Lattanzi G, Maraldi NM, Beltran-Valero de Barnabe D, van Bokoven H, Squarzoni S, Merlini L (2003) Extracellular matrix and nuclear abnormalities in skeletal muscle of a patient with Walker-Warburg syndrome caused by POMT1 mutation. *Biochim Biophys Acta* 1638: 57-62
- Saito F, Masaki T, Saito Y, Nakamura A, Takeda S, Shimizu T, Toda T, Matsumura K (2007) Defective peripheral nerve myelination and neuromuscular junction formation in fukutin-deficient chimeric mice. *J Neurochem*
- Sasaki J, Ishikawa K, Kobayashi K, Kondo-Iida E, Fukayama M, Mizusawa H, Takashima S, Sakakihara Y, Nakamura Y, Toda T (2000) Neuronal expression of the fukutin gene. *Hum Mol Genet* 9: 3083-90
- Sasaki T, Yamada H, Matsumura K, Shimizu T, Kobata A, Endo T (1998) Detection of O-mannosyl glycans in rabbit skeletal muscle alpha-dystroglycan. *Biochim Biophys Acta* 1425: 599-606
- Silan F, Yoshioka M, Kobayashi K, Simsek E, Tunc M, Alper M, Cam M, Guven A, Fukuda Y, Kinoshita M, Kocabay K, Toda T (2003) A new mutation of the fukutin gene in a non-Japanese patient. *Ann Neurol* 53: 392-6



- Singh J, Itahana Y, Knight-Krajewski S, Kanagawa M, Campbell KP, Bissell MJ, Muschler J (2004) Proteolytic enzymes and altered glycosylation modulate dystroglycan function in carcinoma cells. *Cancer Res* 64: 6152-9
- Taniguchi K, Kobayashi K, Saito K, Yamanouchi H, Ohnuma A, Hayashi YK, Manya H, Jin DK, Lee M, Parano E, Falsaperla R, Pavone P, Van Coster R, Talim B, Steinbrecher A, Straub V, Nishino I, Topaloglu H, Voit T, Endo T, Toda T (2003) Worldwide distribution and broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. *Hum Mol Genet* 12: 527-34
- Topaloglu H, Brockington M, Yuva Y, Talim B, Haliloglu G, Blake D, Torelli S, Brown SC, Muntoni F (2003) FKRPF gene mutations cause congenital muscular dystrophy, mental retardation, and cerebellar cysts. *Neurology* 60: 988-92
- van Reeuwijk J, Brunner HG, van Bokhoven H (2005a) Glyc-O-genetics of Walker-Warburg syndrome. *Clin Genet* 67: 281-9
- van Reeuwijk J, Grewal PK, Salih MA, Beltran-Valero de Bernabe D, McLaughlan JM, Michielse CB, Herrmann R, Hewitt JE, Steinbrecher A, Seidahmed MZ, Shaheed MM, Abomelha A, Brunner HG, van Bokhoven H, Voit T (2007) Intragenic deletion in the LARGE gene causes Walker-Warburg syndrome. *Hum Genet*
- van Reeuwijk J, Janssen M, van den Elzen C, Beltran-Valero de Bernabe D, Sabatelli P, Merlini L, Boon M, Scheffer H, Brockington M, Muntoni F, Huynen MA, Verrips A, Walsh CA, Barth PG, Brunner HG, van Bokhoven H (2005b) POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet* 42: 907-12
- 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 (2006) The expanding phenotype of POMT1 mutations: from Walker-Warburg syndrome to congenital muscular dystrophy, microcephaly, and mental retardation. *Hum Mutat* 27: 453-9
- Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost MC, Faure A, Chateau D, Chapon F, Tome F, Dupret JM, Paulin D, Fardeau M (1998) A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet* 20: 92-5
- Vogel MW, Caston J, Yuzaki M, Mariani J (2007) The Lurcher mouse: fresh insights from an old mutant. *Brain Res* 1140: 4-18
- Watanabe M, Kobayashi K, Jin F, Park KS, Yamada T, Tokunaga K, Toda T (2005) Founder SVA retrotransposal insertion in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and its origin in Japanese and Northeast Asian populations. *Am J Med Genet A* 138: 344-8
- Willer T, Amselgruber W, Deutzmann R, Strahl S (2002) Characterization of POMT2, a novel member of the PMT protein O-mannosyltransferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids. *Glycobiology* 12: 771-83
- Willer T, Prados B, Falcon-Perez JM, Renner-Muller I, Przemeck GK, Lommel M, Coloma A, Valero MC, de Angelis MH, Tanner W, Wolf E, Strahl S, Cruces J (2004) Targeted disruption of the Walker-Warburg syndrome gene Pomt1 in mouse results in embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14126-31
- Willer T, Valero MC, Tanner W, Cruces J, Strahl S (2003) O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr Opin Struct Biol* 13: 621-30
- 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 (2006) Molecular interaction between fukutin and POMGnT1 in the glycosylation pathway of alpha-dystroglycan. *Biochem Biophys Res Commun* 350: 935-41



- Yamamoto T, Kato Y, Kawaguchi M, Shibata N, Kobayashi M (2004) Expression and localization of fukutin, POMGnT1, and POMT1 in the central nervous system: consideration for functions of fukutin. *Med Electron Microsc* 37: 200-7
- Yamamoto T, Kawaguchi M, Sakayori N, Muramatsu F, Morikawa S, Kato Y, Shibata N, Kobayashi M (2006) Intracellular binding of fukutin and alpha-dystroglycan: relation to glycosylation of alpha-dystroglycan. *Neurosci Res* 56: 391-9
- Yanagisawa A, Bouchet C, Van den Bergh PY, Cuisset JM, Viollet L, Leturcq F, Romero NB, Quijano-Roy S, Fardeau M, Seta N, Guicheney P (2007) New POMT2 mutations causing congenital muscular dystrophy: identification of a founder mutation. *Neurology* 69: 1254-60
- Yoshioka M, Kuroki S (1994) Clinical spectrum and genetic studies of Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 53: 245-50

Anexo



El trabajo desarrollado durante esta tesis doctoral ha dado lugar a la publicación del siguiente artículo:

(Cotarelo *et al.*, 2008)

Cotarelo R.P., Valero M.C., Prados B., Peña A., Rodríguez L., Fano O., Marco J.J., Martínez-Frías M.L. and Cruces J. “Two new patients bearing mutations in the *Fukutin* gene confirm the relevance of this gene in Walker-Warburg syndrome”. *Clinical Genetics*. 73:139-45.

Además, durante la realización de la tesis el doctorando ha participado en una publicación adicional:

(Prados *et al.*, 2007)

Belén Prados, Almudena Peña, Rocío P. Cotarelo, M. Carmen Valero and Jesús Cruces. “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”. *American Journal of Pathology* 170: 1659-68.

Short Report

Two new patients bearing mutations in the *fukutin* gene confirm the relevance of this gene in Walker–Warburg syndrome

Cotarelo RP, Valero MC, Prados B, Peña A, Rodríguez L, Fano O, Marco JJ, Martínez-Frías ML, Cruces J. Two new patients bearing mutations in the *fukutin* gene confirm the relevance of this gene in Walker–Warburg syndrome. Clin Genet 2007. © Blackwell Munksgaard, 2007

Walker–Warburg syndrome (WWS) is an autosomal recessive disorder characterized by congenital muscular dystrophy, brain malformations and structural abnormalities of the eye. We have studied two WWS patients born to non-consanguineous parents, and in both cases, we identified mutations in the *fukutin* gene responsible for this syndrome. One of the patients carries a homozygous-single nucleotide insertion that produces a frameshift, being this the first time that this insertion has been described in homozygosis and causing a WWS phenotype. The other patient carries two novel mutations, one being a point mutation that produces an amino acid substitution, while the other is a deletion in the 3' UTR that affects the polyadenylation signal of the *fukutin* gene. This deletion would probably result in the complete loss of the *fukutin* transcripts from this allele. This is the first time a mutation localized outside of the *fukutin* coding region has been identified as a cause of WWS.

**RP Cotarelo^a, MC Valero^a,
B Prados^a, A Peña^a,
L Rodríguez^{b,d}, O Fano^a,
JJ Marco^c, ML Martínez-Frías^{b,d}
and J Cruces^a**

^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, ^bCentro de Investigación sobre Anomalías Congénitas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, ^cHospital Arnau de Villanova, Lérida, Spain, and ^dCenter for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER)

Key words: α -dystroglycanopathies – fukutin – Walker–Warburg syndrome

Corresponding author: Dr Jesús Cruces, Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.
Tel.: +34 91 497 5406;
fax: +34 91 585 4401;
e-mail: jesus.cruces@uam.es

Received 3 August 2007, revised and accepted for publication 1 November 2007

Walker–Warburg syndrome (WWS, OMIM 236670), muscle-eye-brain disease (MEB, OMIM 253280) and Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD, OMIM 253800) are clinically similar autosomal recessive disorders that are characterized by congenital muscular dystrophy (CMD), brain malformations and structural eye abnormalities (1–3). Brain defects include neuronal overmigration that causes type II lissencephaly, fusion of the hemispheres, agenesis of the corpus callosum, cerebellar hypoplasia, and hydrocephalus (4). As all these pathologies involve the functional disruption of α -dystroglycan

(α -DG), they have been included in a category of diseases known as *α -dystroglycanopathies* (2). WWS is the most severe of these three conditions, especially with regards to the brain phenotype. Indeed, WWS patients are severely affected from birth and their life expectancy is usually less than 1 year.

Mutations in the *protein O-mannosyltransferase 1 (POMT1)* gene have been associated with this condition (1), and we demonstrated that targeted disruption of the *Pomt1* gene in mice produces embryonic lethality. Indeed, during mouse embryonic development, the mouse *Pomt1* gene is

expressed in those tissues most severely affected in WWS patients (5). We have recently reported that mouse *Pomt1* expression persists in the muscle and eye in later developmental stages and notably, that its expression is particularly high in regions of the brain and cerebellum that could generate the defects observed in WWS (6).

However, mutations in this gene have only been found in 20% of patients diagnosed with WWS (1, 3, 7–9), suggesting that the dysfunction of other genes might give rise to WWS. Accordingly, mutations in the *fukutin*, the *fukutin related protein (FKRP)*, the *protein O-mannosyltransferase 2 (POMT2)*, and very recently in the *LARGE* genes have also been shown to produce WWS (10–14). However, mutations in any of these five genes only account for about 25% of WWS patients.

The *fukutin* gene was first described as the gene responsible for FCMD, one of the most common autosomal recessive disorders in Japan. The typical cause of this disease is a 3-kb SVA-type retrotransposal insertion into the 3' UTR of this gene, which results in a reduction of mRNA levels (15). Homozygous nonsense point mutations within the coding region produce a more severe pathology compatible with WWS (10, 11). However, very recently three patients with point mutations in the coding sequence of the *fukutin* gene were diagnosed with a variant of LGMD2 with no brain involvement (16). In another study, six other patients with normal intelligence were found to be heterozygous for the retrotransposal insertion, and a point mutation within the *fukutin* coding sequence. These individuals developed a cardiomyopathy associated with no or minimal limb girdle muscular involvement (17). Thus, it seems that the clinical spectrum of the diseases associated with mutations in the *fukutin* gene is expanding depending on the type of mutation that arises.

Fukutin is a Golgi-resident protein with homology to bacterial glycosyltransferases (18). Glycosylated α -DG is not detected in muscle biopsies from FCMD patients (19), or in these recently discovered LGMD patients with mutations in the *fukutin* gene. With respect to the brain phenotype of FCMD and WWS patients, fukutin has been shown to be expressed in astrocytes together with POMT1 and POMGnT1, suggesting that these proteins could also be involved in aspects of neuronal migration (20). Defective peripheral nerve myelination and neuromuscular junction formation has just been demonstrated in fukutin-deficient chimeric mice, indicating that fukutin plays a crucial role in these events and reaffirming its importance in neuronal processes. Similarly, a large reduction in the sugar chain moiety of α -DG and in laminin-binding activity was also

observed in the peripheral nerve of chimeric mice, suggesting that α -DG hypoglycosylation might be involved in the pathogenesis of the aforementioned phenotype (21).

Recent ELISA-based binding assays have also provided evidence of a possible interaction between fukutin and α -DG (22). Hence, when considered together with primary structure analysis (18), these data suggest that fukutin might be involved in α -DG glycosylation. On the other hand, an interaction between fukutin and POMGnT1 has been proposed, suggesting that fukutin may modulate POMGnT1 activity (23). Despite this information, the function of fukutin still remains unclear.

Patients and methods

Patient 1

This female Spanish patient was the result of the first pregnancy of young and healthy non-consanguineous parents, a 30-year-old mother and a 32-year-old father. The pregnancy was uneventful and ended spontaneously at 35 weeks of gestation with the birth of this patient. At 15 weeks of pregnancy, amniocentesis was performed resulting in a normal karyotype, 46 XX. The newborn girl weighed 2.7 kg and had an Apgar score of 7/9. A dysmorphic face, low implanted and malformed ears were detected on examination (Fig. 1a), as well as a left preauricular tag, thoracic hemivertebrae and cardiac defects. Toxoplasmosis, Rubella, Cytomegalovirus, and Herpes simplex virus serology was negative. A computed tomography scan revealed overriding cranial bones, severe left microphthalmia, monolobar holoprosencephaly, and internal and external hydrocephalus (Fig. 1b, c). The cortex and white matter could not be differentiated, and no details could be observed in the posterior fossa. On the fourth day of life, the infant began to suffer respiratory apnea and bradycardia, and she died on the following day. At autopsy, the medial aspect of the brain showed an interhemispheric cyst, incomplete cleavage of the thalamus and corpora quadrigemina, an absent corpus callosum and rhombencephalic hypoplasia. Punctate haemorrhages were in the parenchyma and ventriculitis was identified. An atrial septal defect (foramen ovale), double subaortic ventricular defect, hypoplastic left ventricle outlet, stenotic pulmonary valve and infundibular transposition of great vessels with no innominate vein were also found. The eyes were malformed, exhibiting retinal dysplasia.

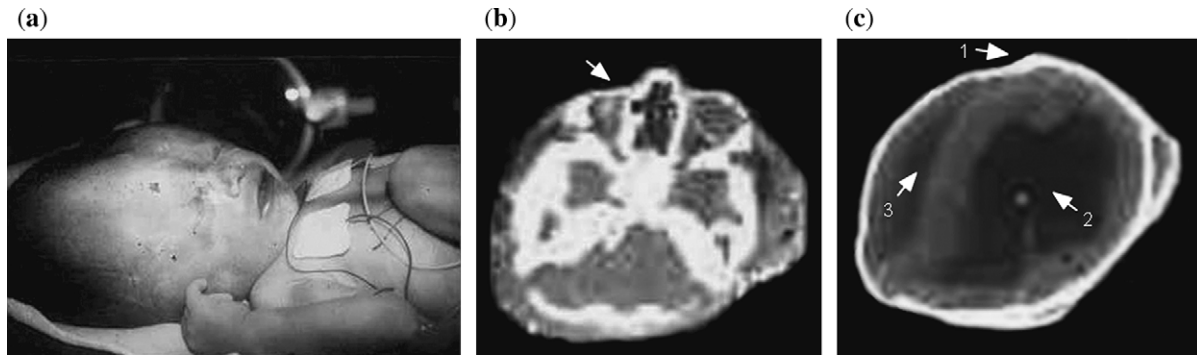


Fig. 1. (a) Clinical photograph of patient 1 showing a dysmorphic face, and low set and malformed ears. (b and c) Different sections of the computed tomography scan in which the arrows indicate the following anomalies: (b) severe left microphthalmia, (c) overriding cranial bones; 1, hydrocephalus inside; 2, and outside of the cerebral cortex; 3. Holoprosencephaly can also be observed.

Family 2

The son of Ashkenazi Jewish parents was diagnosed with WWS, and we had access to cell lines from all three family members, both parents and the son. The cell lines came from the Coriell Cell Repositories, Camden, New Jersey: repositories GM10180, GM10181 and GM10182. The affected male sibling developed hydrocephalus, agyria, retinal dysplasia, ventriculomegaly with lissencephaly, and occipital bone defect with extrusion of the CNS, microcornea, microphthalmia, cataracts and elevated serum creatine kinase levels. The parents were healthy and non-consanguineous. As anonymity is guaranteed in these cases, we have not had access to information regarding the lifespan of this patient or to any clinical or pathology images. Nevertheless, the symptoms displayed clearly support a diagnosis of WWS.

Sequence analysis

The entire coding region of the *POMT1*, *POMT2*, *fukutin* and *FKRP* genes was screened for mutations, as these are the four genes currently thought to be responsible for WWS. The *LARGE* gene was not analysed here as its potential involvement in WWS had not been implicated when this work was undertaken. The analysis included screening the exon–intron boundaries in DNA samples from both the patient and their direct relatives, as well as the region 5' upstream of the transcriptional start site and the polyadenylation region.

Restriction endonuclease enzyme analysis

The c.373G>A sequence variant found in the *fukutin* gene generates a new *AluI* restriction site. We examined whether this variant was repre-

sented in 52 healthy individuals by restriction digestion (104 chromosomes). This alteration was not registered in SNPs, ESTs or trace human databases.

Polymerase chain reaction analysis

We determined whether the *5370 to *5842 deletion found in patient 1 was a polymorphism by amplifying the same segment of the gene in 100 individuals. A single 621 bp polymerase chain reaction (PCR) product was obtained in all cases, excluding the possibility that this deletion existed as a polymorphism.

Results

In this study, we have analysed two WWS patients and both were found to carry mutations in the *fukutin* gene.

Patient 1

This patient is heterozygous for a point mutation in exon 5 that causes a c.373G>A transition that is predicted to produce the conversion p.G125S (Fig. 2a). When we sequenced the rest of the coding region no further mutations could be found. PCR amplification of the terminal part of exon 10 produced two fragments of different sizes. While the 621-bp fragment amplified corresponded to the size predicted, an additional band of approximately 150 bp was also observed (148 bp, Fig. 2d). When we sequenced this small band, we identified a 473-bp deletion of the 3'UTR region from nucleotide *5370 to *5842 (Fig. 2c). Significantly, this deletion included the polyadenylation signal. This patient was not a carrier of the founder retrotransposal insertion assessed by the three

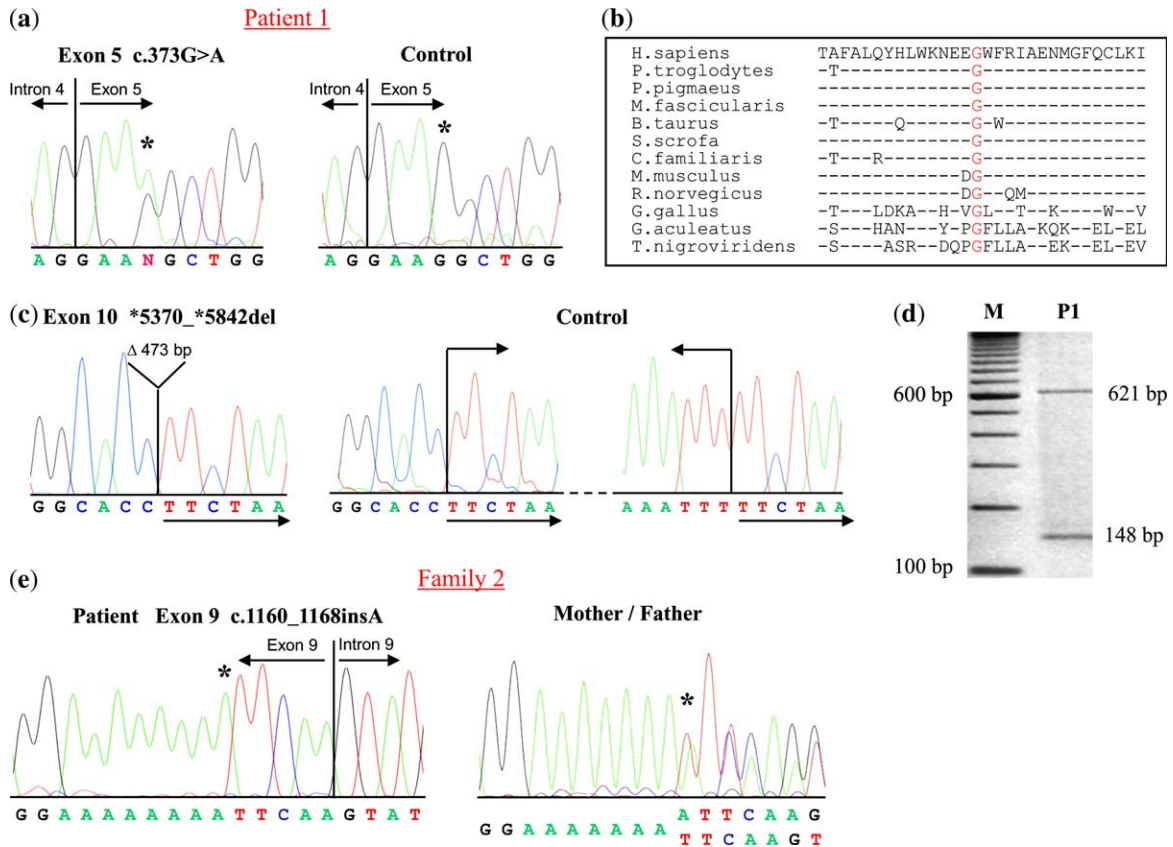


Fig. 2. Mutations in the *fukutin* gene in patient 1 and family 2. (a) Patient 1 carries the c.373G>A mutation that predicts a p.G125S change. (b) This glycine is conserved in vertebrates. (c) Deletion of 473 bp in the 3' UTR of the *fukutin* gene. Arrows indicate the direct repeats between which a recombination event might have occurred. (d) Polymerase chain reaction products resulting from the amplification of the last part of exon 10 from which two fragments of 621 bp and 148 bp were generated. M, 100-bp DNA ladder; P1, Patient 1. (e) In family 2, the patient is homozygous for the insA_F390I_403X mutation while both parents are carriers.

primer PCR method described by Watanabe et al. (15) (data not shown).

Family 2

The mutation found in this family involves the insertion of an additional adenine within a stretch of six adenine residues in exon 9 (1160_1168insA). This insertion gives rise to a frameshift at amino acid 390 that is predicted to produce the substitution of the last 72 amino acids for 13 different ones, generating a premature stop codon at amino acid 403. The patient was homozygous for this insertion and both unrelated parents were carriers of the insertion (Fig. 2e). This mutation has been corroborated at the messenger RNA (mRNA) level (Fig. S1, Supplementary material online).

Discussion

In this study, we describe two new mutations in the *fukutin* gene that cause WWS. The first one,

detected in patient 1, affects an amino acid that is conserved in vertebrates (G125S, Fig. 2b), corroborating its importance in protein function. Indeed, this hydrophilic change could affect *fukutin* structure and function. The patient was heterozygous for this mutation and to date, only two patients with homozygous nonsense mutations in the coding regions of both *fukutin* gene alleles have been seen to display a WWS phenotype (10, 11). These mutations would lead to a complete loss of *fukutin* protein function. Patients that are heterozygous for the retrotransposal insertion at the 3' UTR and a point mutation within the coding region, or even those that are homozygous for this retrotransposal insertion, develop FCMD (24, 25).

A second mutation was also found in this patient that involved a deletion at the end of exon 10 of the *fukutin* gene, in the 3' UTR (Fig. 2c). Examining the sequence, we found two direct repeats (TTCTAA, indicated by arrows in Fig. 2c). We hypothesize that a recombination event could

have occurred, resulting in the removal of the sequence flanked by these repeats. This deletion affects the gene's polyadenylation signal, which is necessary for the correct addition of adenines at the 3' end of the mRNA.

Polyadenylation is an essential processing step for almost all eukaryotic mRNAs. It is a complex reaction that requires many multisubunits and cis-acting sequences for the correct poly(A) addition (26). The poly(A) tail plays an important role in nuclear mRNA processing, export to the cytoplasm, translation and transcript stability. Indeed, there are several diseases associated with mutations in the polyadenylation signal (27, 28). The mutation in the poly(A) signal should be significant enough to abolish the fukutin protein function, as it gives rise to WWS in combination with another mutation that is also expected to be severe. The messenger that arises from this poly(A) signal is the major transcript, 7.5 kb in length, although a second poly(A) signal has been described 1-kb upstream. Indeed, weak expression of this second minor 6.5-kb mRNA transcript can be observed in all tissues when analysed by northern blotting (29). Significantly, the expression of this second 6.5-kb messenger is almost 10-fold lower than the 7.5 transcript in foetal brain (30), where fukutin would play an important role in neuronal migration and therefore, in brain formation. This implies that this minor messenger is unlikely to be able to replace the functions fulfilled by the 7.5-kb transcript. The two mutations in the *fukutin* gene found in this patient have not been described previously in FCMD, WWS or LGMD patients.

The mutation found in family 2 (1160_1168insA) has been detected for the first time in a homozygous form in a patient. However, this same mutation

had previously been found in a heterozygous state, coupled with the retrotransposal insertion, in a patient diagnosed with severe FCMD (24). In our patient, the mutation had been inherited from both parents even though this is a non-consanguineous family (Fig. 2e). Recently, this same mutation was described in two patients diagnosed with a new type of LGMD2 with no brain involvement (16). When this occurs as a homozygous mutation, it appears to give rise to a more severe phenotype compatible with WWS, as occurs in patient 2. However, when it is found in the heterozygous state with other mutations it gives rise to a less severe phenotype, as occurs in the two LGMD2 patients described above. Therefore, we postulate that the 1160_1168insA mutation gives rise to a fukutin protein that is only mildly functional, and that the new mutations described in the LGMD2 patients are responsible for the mild phenotype observed.

One of these mutations lies at the end of the protein, eliminating only the activity associated with the last six amino acids. The other mutation gives rise to a p.R307Q substitution, a conservative change that would not be expected to be very meaningful. Indeed, a reported polymorphism within the coding region of the *fukutin* gene that involves a similar substitution (R203Q) has no phenotypic effect (25). Moreover, site directed mutagenesis studies of these two mutations in CHO (Chinese Hamster Ovary) cells show that the mutated fukutin retains its Golgi localization and that it is correctly expressed (16), indicating that it may retain some activity. The mutation found in patient 2 and shared in heterozygosis by these LGMD2 patients, is expected to be severe because it causes a WWS phenotype. This effect could be brought about by nonsense-mediated mRNA

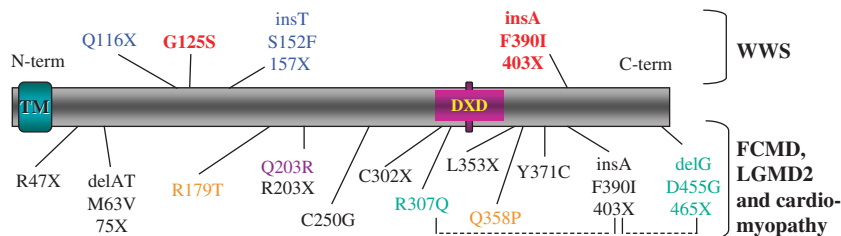


Fig. 3. Schematic representation of the fukutin protein. The unique predicted transmembrane domain and the DXD (Asp, any other aminoacid, Asp) motif are shown. The N-terminus is located in the cytoplasm and the C-terminus in the Golgi lumen. All the mutations in the *fukutin* gene reported to date are shown. Mutations resulting in WWS are indicated above the schematic representation while the mutations resulting in milder phenotypes are shown below. The mutations described in heterozygous Fukuyama congenital muscular dystrophy patients carrying a point mutation and the retrotransposal insertion are shown in black. The Q203R non-synonymous polymorphism can be seen in purple, and the mutations that give rise to a type of LGMD2 when heterozygous with the insA_F390I_403X mutation are in green (connected by discontinuous lines). The mutations in orange cause cardiomyopathy when they are heterozygous with the retrotransposal insertion, and the homozygous nonsense mutations that cause Walker–Warburg syndrome are in blue. The mutations described in this work are represented in red: the p.G125S substitution occurs in heterozygosis with the poly(A) signal deletion in patient 1, and the insA_F390I_403X mutation occurs homozygously in patient 2.

decay (31) or it may reflect the lack of protein function when this terminal domain is lost. At least one of the parents in both LGMD2 families was of Jewish origin, like both parents of patient 2, and they carried the homozygous 1160_1168insA mutation. These data suggest a possible founder mutation in the Jewish population.

A schematic overview of all the *fukutin* mutations known to cause WWS to date is given in Fig. 3, including those reported in this work. These data indicate that point mutations in potentially important domains of the coding region of the *fukutin* gene, or null mutations, generate a severe WWS phenotype as seen in the two previously published cases (10, 11). Alternatively, other mutations may lead to the development of a less severe phenotype.

Our study corroborates the relevance of fukutin in the aetiology of WWS and provides evidence that it is involved in congenital muscular dystrophies, probably because of defective O-mannosylation of α -DG. It is likely that the complete loss of fukutin activity leads to the WWS phenotype. In contrast, mutations that produce a fukutin protein with partial activity develop a less severe phenotype such as FCMD, a type of LGMD2, or mild phenotypes such as a cardiomyopathy with minimal muscle weakness. Additional studies will be necessary to determine the important protein domains in fukutin and to elucidate its function.

Supplementary material

Fig. S1. mRNA transcripts confirm the effect of the 1160_1168insA mutation in the *fukutin* gene. The patient is homozygous for the mutation while the parents are heterozygous.

Supplementary material is available as part of the online article at <http://www.blackwell-synergy.com>

Acknowledgements

We thank Paula Blanco and Raúl Borrego for excellent technical assistance. We are grateful to M. Sefton for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Spanish Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF03-01619) and Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI02/0715). R. P. C., B. P. and A. P. are F. P. I., F. I. S. and F. P. U. fellows, respectively. While this paper was being published, a new patient with a homozygous non sense mutation in the *fukutin* gene was reported by Godfrey et al. (Brain 2007: 130: 2725–2735). This is the fifth WWS patient harboring mutations in the *fukutin* gene, contributing to the evidence that this gene is prevalent in this syndrome.

References

1. Beltran-Valero de Bernabe D, Currier S, Steinbrecher A 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: 1033–1043.
2. Muntoni F, Voit T. The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress. *Neuromuscul Disord* 2004; 14: 635–649.
3. Sabatelli P, Columbaro M, Mura I et al. Extracellular matrix and nuclear abnormalities in skeletal muscle of a patient with Walker-Warburg syndrome caused by POMT1 mutation. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1638: 57–62.
4. van Reeuwijk J, Brunner HG, van Bokhoven H. Glyco-O-genetics of Walker-Warburg syndrome. *Clin Genet* 2005; 67: 281–289.
5. Willer T, Prados B, Falcon-Perez JM et al. Targeted disruption of the Walker-Warburg syndrome gene *Pomt1* in mouse results in embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 14126–14131.
6. Prados B, Pena A, Cotarelo RP et al. 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.
7. Kim DS, Hayashi YK, Matsumoto H et al. POMT1 mutation results in defective glycosylation and loss of laminin-binding activity in alpha-DG. *Neurology* 2004; 62: 1009–1011.
8. Currier SC, Lee CK, Chang BS et al. Mutations in POMT1 are found in a minority of patients with Walker-Warburg syndrome. *Am J Med Genet A* 2005; 133: 53–57.
9. van Reeuwijk J, Maugendre S, van den Elzen C et al. The expanding phenotype of POMT1 mutations: from Walker-Warburg syndrome to congenital muscular dystrophy, microcephaly, and mental retardation. *Hum Mutat* 2006; 27: 453–459.
10. de Bernabe DB, van Bokhoven H, van Beusekom E et al. A homozygous nonsense mutation in the fukutin gene causes a Walker-Warburg syndrome phenotype. *J Med Genet* 2003; 40: 845–848.
11. Silan F, Yoshioka M, Kobayashi K et al. A new mutation of the fukutin gene in a non-Japanese patient. *Ann Neurol* 2003; 53: 392–396.
12. Beltran-Valero de Bernabe D, Voit T, Longman C et al. Mutations in the FKRP gene can cause muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet* 2004; 41: e61.
13. van Reeuwijk J, Janssen M, van den Elzen C et al. POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet* 2005; 42: 907–912.
14. van Reeuwijk J, Grewal PK, Salih MA et al. Intragenic deletion in the LARGE gene causes Walker-Warburg syndrome. *Hum Genet* 2007; 121: 685–690.
15. Watanabe M, Kobayashi K, Jin F et al. Founder SVA retrotransposon insertion in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and its origin in Japanese and Northeast Asian populations. *Am J Med Genet A* 2005; 138: 344–348.
16. Godfrey C, Escolar D, Brockington M et al. Fukutin gene mutations in steroid-responsive limb girdle muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2006; 60: 603–610.
17. Murakami T, Hayashi YK, Noguchi S et al. Fukutin gene mutations cause dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness. *Ann Neurol* 2006; 60: 597–602.
18. Aravind L, Koonin EV. The fukutin protein family-predicted enzymes modifying cell-surface molecules. *Curr Biol* 1999; 9: R836–R837.
19. Hayashi YK, Ogawa M, Tagawa K et al. Selective deficiency of alpha-dystroglycan in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Neurology* 2001; 57: 115–121.
20. Yamamoto T, Kato Y, Kawaguchi M et al. Expression and localization of fukutin, POMGnT1, and POMT1 in the

- central nervous system: consideration for functions of fukutin. *Med Electron Microsc* 2004; 37: 200–207.
21. Saito F, Masaki T, Saito Y et al. Defective peripheral nerve myelination and neuromuscular junction formation in fukutin-deficient chimeric mice. *J Neurochem* 2007; 101: 1712–1722.
 22. Yamamoto T, Kawaguchi M, Sakayori N et al. Intracellular binding of fukutin and alpha-dystroglycan: relation to glycosylation of alpha-dystroglycan. *Neurosci Res* 2006; 56: 391–399.
 23. Xiong H, Kobayashi K, Tachikawa M et al. Molecular interaction between fukutin and POMGnT1 in the glycosylation pathway of alpha-dystroglycan. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350: 935–941.
 24. Kondo-Iida E, Kobayashi K, Watanabe M et al. Novel mutations and genotype-phenotype relationships in 107 families with Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Mol Genet* 1999; 8: 2303–2309.
 25. Kobayashi K, Sasaki J, Kondo-Iida E et al. Structural organization, complete genomic sequences and mutational analyses of the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy gene, fukutin. *FEBS Lett* 2001; 489: 192–196.
 26. Proudfoot N, O'Sullivan J. Polyadenylation: a tail of two complexes. *Curr Biol* 2002; 12: R855–R857.
 27. Bennett CL, Brunkow ME, Ramsdell F et al. A rare polyadenylation signal mutation of the FOXP3 gene (AAUAAA->AAUGAA) leads to the IPEX syndrome. *Immunogenetics* 2001; 53: 435–439.
 28. Henderson S, Chapple M, Rugless M et al. Haemoglobin H hydrops fetalis syndrome associated with homozygosity for the alpha2-globin gene polyadenylation signal mutation AATAAA->AATA. *Br J Haematol* 2006; 135: 743–745.
 29. Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M et al. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 1998; 394: 388–392.
 30. Sasaki J, Ishikawa K, Kobayashi K et al. Neuronal expression of the fukutin gene. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 3083–3090.
 31. Rehwinkel J, Raes J, Izaurralde E. Nonsense-mediated mRNA decay: target genes and functional diversification of effectors. *Trends Biochem Sci* 2006; 31: 639–646.

Molecular Pathogenesis of Genetic and Inherited Diseases

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

Belén Prados, Almudena Peña, Rocío P. Cotarelo, M. Carmen Valero, and Jesús Cruces

From the Department of Biochemistry, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" Centro Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Walker-Warburg syndrome (WWS) is the most severe of a group of congenital disorders that have in common defects in the O-glycosylation of α -dystroglycan. WWS is characterized by congenital muscular dystrophy coupled with severe ocular and brain malformations. Moreover, in at least one-fifth of the reported cases, mutations in the *POMT1* gene are responsible for this disease. During embryonic development (E8.5 to E11.5), the mouse *Pomt1* gene is expressed in the tissues most severely affected in WWS, the muscle, eye, and brain. In this study, we show that mPomt1 expression is maintained in the muscle and eye in later developmental stages and, notably, that its expression is particularly strong in regions of brain and cerebellum that, when affected, could generate the defects observed in patients with WWS. We show that the *Pomt1* protein is localized to the sarcoplasmic reticulum of muscle tissue cells in adult mice, where α -dystroglycan is O-glycosylated. Furthermore, the *Pomt1* protein is localized to the acrosome of maturing spermatids, where α -dystroglycan is not glycosylated, so that *Pomt1* might have a different target for O-mannosylation in the testes. This expression pattern in the testes could also be related to the gonadal anomalies observed in some patients with WWS. (*Am J Pathol* 2007, 170:1659–1668; DOI: 10.2353/ajpath.2007.061264)

Protein O-mannosylation is a very important post-translational modification in eukaryotes. The process takes

place in the endoplasmic reticulum (ER) and is catalyzed by a family of protein mannosyltransferases that are highly conserved from yeast to humans. These mannosyltransferases transfer dolichyl-phosphate-mannose to the Ser/Thr (–OH) residues of target proteins.¹ In humans, as in other higher eukaryotes, two homologous mannosyltransferase members exist, known as protein O-mannosyltransferase 1 and 2 (hPOMT1 and hPOMT2).^{2,3}

In mammals, O-mannosyl glycans are mainly found in α -dystroglycan (α -DG) from peripheral nerve, brain, and skeletal muscle. This α -DG is a central component of the dystrophin glycoprotein complex, acting as a link between extracellular matrix and the cytoskeleton of muscle cells and neurons. Indeed, α -DG represents the most extensively studied glycoprotein with a large number of O-mannosyl glycan residues, which mainly are of the type Sia- α 2-3Gal- β 1-4GlcNAc1-2Man-Ser/Thr.¹ Human POMT1 and POMT2 interact to form a complex that catalyzes O-mannosyl transfer to their main substrate α -DG.^{4,5} In recent years, the importance of O-mannosylation has increased because of its novel association with human diseases.

A series of congenital muscular dystrophies (CMDs) have been described that involve brain and eye alterations of diverse severity, such as Walker-Warburg syndrome (WWS: MIM 236670), muscle-eye-brain disease (MEB: MIM 253280), and Fukuyama CMD (FCMD: MIM 253800). Two other CMDs, type 1C CMD (MDC1C: MIM

Supported by the Spanish Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF03-01619) and Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI02/0715). B.P., A.P., and R.P.C. are Fondo de Investigación Sanitaria, Formación de Profesorado Universitario, and Formación de Personal Investigador fellows, respectively.

Supplemental material for this article can be found on <http://ajp.amjpathol.org>.

Accepted for publication February 6, 2007.

Address reprint requests to Dr. Jesús Cruces, Department of Biochemistry, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain. E-mail: jesus.cruces@uam.es.

606612) and type 1D CMD (MDC1D: MIM 608840), produce minor alterations. The genes principally associated with these diseases are *POMT1*, *POMGnT1*, *fukutin*, *FKRP*, and *LARGE*, respectively, and the products of these genes are involved in the O-glycosylation of α -DG molecules.^{6–9} Indeed, the common feature of all these disorders is the hypoglycosylation of α -DG in muscle biopsies.¹⁰

WWS is an autosomal recessively inherited disease and is the most severe of these conditions. Affected patients show little motor activity due to the severe CMD. The brain anomalies originated by the defects in neuronal migration include type II lissencephaly typically involving the disorganization of the cortex in the cerebral hemispheres and cerebellum, agenesis of the corpus callosum, hydrocephalus, absence of septum and cerebellar vermis, agyria, fusion of cerebral hemispheres, dilation of the fourth ventricle, and occasionally, occipital encephalocele. Among the eye abnormalities, cataracts, buphthalmia, microphthalmia, and persistent hyperplastic primary vitreous have been described. Patients with WWS usually die within the first months of age, reaching 3 years in some isolated cases.^{11–13}

WWS is produced by mutations in the *hPOMT1* gene in at least 20% of cases.^{14,15} Other causative genes have been identified in a small percentage such as *POMT2*, *FKRP*, or *fukutin*, implying that WWS is a genetically heterogeneous disorder.^{16–18} Recently, two other muscular dystrophies with mental retardation but without eye abnormalities have been reported that are caused by *hPOMT1* mutations: CMD/MR, a milder form of WWS,¹⁵ and the autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2K: MIM 609308).¹⁹ Furthermore, mutations in *hPOMT2* gene have also been found in a milder form of CMD previously described as “MEB-like” disease, which displays similar clinical aspects to the CMD/MR caused by mutations in *hPOMT1*.²⁰

Considering that several neuromuscular disorders are caused by mutations in the *hPOMT1* gene, it would be helpful to establish a relationship between POMT1 expression and the clinical phenotypes observed in these disorders. Because the human and mouse POMT1 proteins are highly homologous and their RNA expression patterns are very similar in adult tissues,²¹ information obtained in the mouse could be relevant to humans.

We previously reported that during mouse embryonic development (E8.5 to E11.5), the *mPomt1* gene is expressed in those tissues most severely affected in patients with WWS. We also showed that O-mannosyl glycans are not only important in human disease but also in critical processes during embryonic development, such as the formation of early basement membranes. Indeed, targeted disruption of the murine *Pomt1* gene results in embryonic lethality due to the defective assembly of Reiter's membrane.²¹

Here, we show that in advanced developmental stages, the expression of murine *Pomt1* is maintained in the tissues affected in patients with WWS. Indeed, *Pomt1* is mainly expressed in those regions critical for correct brain and cerebellum development, which when affected may give rise to the multiple brain abnormalities ob-

served in patients with WWS. We also show that in the adult mouse, the *Pomt1* protein is located, together with *Pomt2*, in the sarcoplasmic reticulum of muscle tissue cells, where the O-mannosylation of α -DG takes place. This distribution is consistent with the muscular dystrophy displayed by patients with disorders caused by mutations in *hPOMT1* or *hPOMT2* genes: WWS, CMD/MR, and LGMD2K. We have also detected the m*Pomt1* protein in the testes, in the acrosome of maturing spermatids, in a similar expression pattern to that described for m*Pomt2*.³ These expression data are in accordance with the fact that POMT1 and POMT2 act together in driving O-mannosylation.^{4,5} Furthermore, the expression in mouse testes suggests that POMT1 could be related to the gonadal defects presented by some patients with WWS²² and that POMT1/POMT2 may have a different O-mannosylation substrate because α -DG is not glycosylated in these cells.

Materials and Methods

Animals

The mice used in this study were bred and maintained on BALB/c and 129P2/Ola genetic backgrounds. All animal handling procedures were in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and they were approved by the Ethics Committee of the Universidad Autónoma de Madrid. We used embryos (E12.5 and E13.5), tissue extracts, or tissue sections from young adult animals (3 to 9 months old). We also used male heterozygous *Pomt1*^{+/-21} and wild-type (wt) females for the fertility test.

Embryos and Tissue Preparation for *In Situ* Hybridization and Immunofluorescence

Embryos were dissected out from the uteri of pregnant females at E12.5 and E13.5, and other tissues were obtained from young adult animals. Whole embryos or tissues were extracted in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde in PBS. The tissues were cryoprotected overnight at 4°C in 15% sucrose/PBS and then embedded at 37°C in 15% sucrose/7% gelatin in PBS. Gelatin-embedded tissues were frozen in isopentane at -80°C and then sectioned (10 μ m) at -25°C in a cryostat (Cryocut 1900; Leica Microsystems, Deerfield, IL). The resulting slices were used for *in situ* hybridization or immunofluorescence.

Whole-Mount or Tissue Section *In Situ* Hybridization

Sense and antisense *Pomt1* RNA probes²¹ were generated using the digoxigenin RNA labeling kit (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN). *In situ* hybridization with digoxigenin-labeled RNA probes was performed in a similar way for whole-mount embryos or cryosections.²³ Stained embryos were photographed, embedded in su-

crose/gelatin, and cryosectioned (25 μm) at -25°C . Processed embryo sections or stained tissue sections were mounted under coverslips in Mowiol (Molecular Probes).

Antibodies

The rabbit polyclonal anti-POMT1 antiserum (SP26) was produced by Eurogentec (Seraing, Belgium) using a synthetic peptide coupled to keyhole limpet hemocyanin corresponding to amino acids 510 to 524 (VEEHRYG-ASQEQRER) of the human POMT1 protein. The resulting antiserum was affinity-purified using a chromatography column of the antigenic peptide covalently bound to Sepharose. The affinity-purified antibody was used to probe Western blots (1:1000) or for immunofluorescence (1:25). The polyclonal anti-POMT2 antiserum³ (immunofluorescence, 1:25) was kindly provided by Dr. Sabine Strahl (University of Heidelberg, Heidelberg, Germany). The other antibodies used here were mouse monoclonal anti α -dystroglycan antibodies VIA4-1 (Western blot, 1:1000; immunofluorescence, 1:100; Upstate Biotechnologies, Lake Placid, NY), mouse monoclonal β -dystroglycan antibodies (immunofluorescence, 1:50; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA), and polyclonal anti-calnexin antiserum (immunofluorescence, 1:200; Stressgen Biotechnologies Corp., San Diego, CA).

Isolation of Protein Extracts from Mouse Tissues and Western Blot

All solutions used to obtain protein extracts contained a protease inhibitor mixture: 0.1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antipain, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), and an antiprotease cocktail (Roche Diagnostics). To obtain total extracts, mouse tissues were dissected in PBS and homogenized in lysis buffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 100 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, and 0.1% sodium dodecyl sulfate). After 15 minutes at 4°C , lysates were centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 minutes at 4°C , and the supernatant was used as total protein extract. To obtain the microsomal fraction, tissues were homogenized in membrane buffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, and 0.3 mmol/L MgCl_2) and centrifuged at $900 \times g$ for 10 minutes at 4°C . The supernatant was subsequently centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 minutes at 4°C , and the resulting supernatant was subjected to ultracentrifugation at $45,000 \times g$ for 1 hour at 4°C . The pellet was washed in 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 50 mmol/L MgCl_2 , and 250 mmol/L NaCl and resuspended in the same buffer. Protein quantification was performed by the Bradford assay.

The proteins from the total extracts (30 μg) or the microsomal fraction (50 μg) were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (6 or 8%, respectively) and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Corporation, Billerica, MA). Membranes with total extracts were blocked in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBS-T) and 3% bovine serum albumin and probed with the primary anti-

α -DG antibodies (VIA-4) in TBS-T/3% bovine serum albumin overnight at 4°C . Blots of microsomal extracts were blocked in TBS-T/5% skim milk and probed for 1 hour at room temperature with the affinity-purified anti-POMT1 antiserum in the same buffer. Incubation with anti-mouse-anti-rabbit IgGs conjugated with peroxidase (1:10,000; Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, The Netherlands) secondary antibodies for 1 hour at room temperature followed. Proteins were visualized by enhanced chemiluminescence using the Amersham enhanced chemiluminescence system (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

Immunofluorescence on Tissue Sections

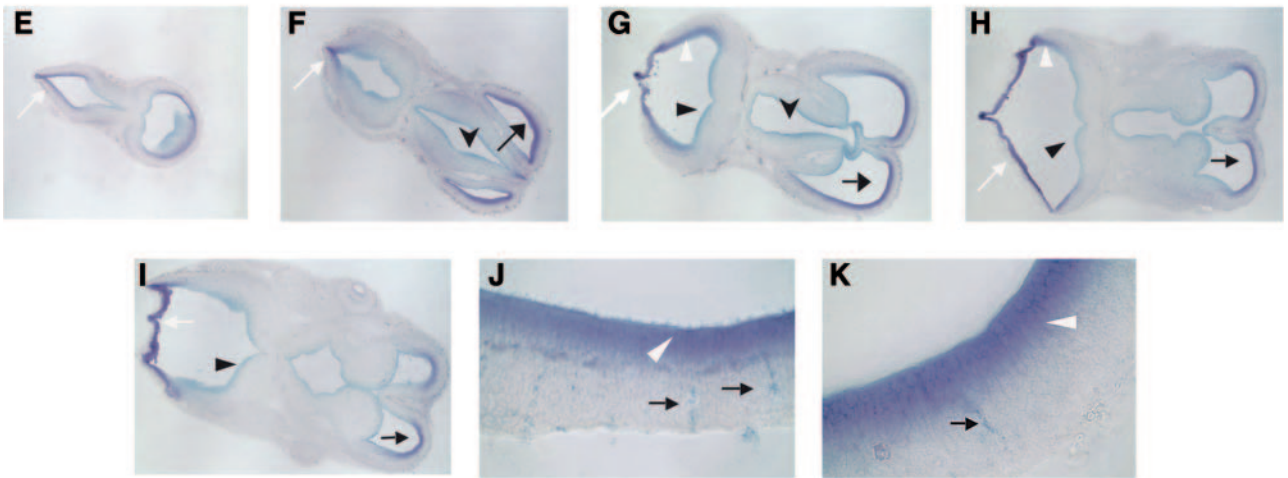
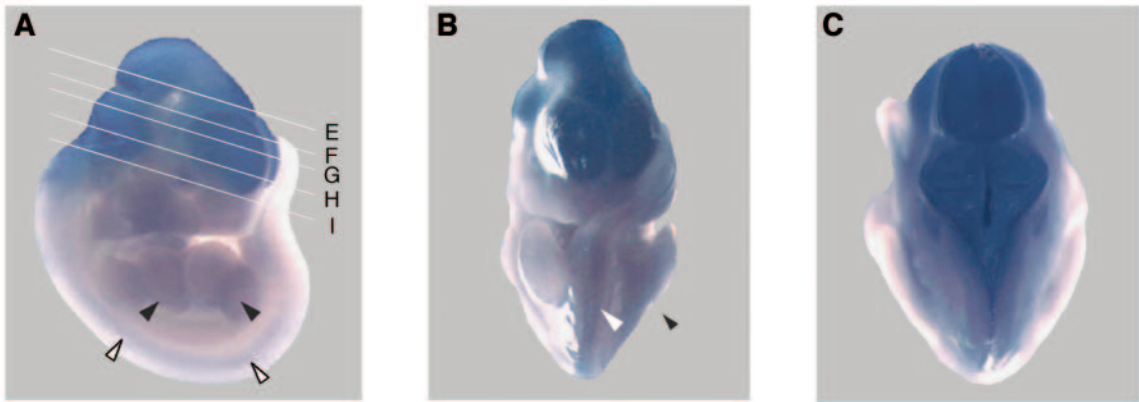
Staining was performed on 10- μm cryosections according to the standard protocol for the mouse on mouse (M.O.M.) Immunodetection Basic kit (Vector Laboratories). Sections were incubated for 1 hour at room temperature with primary antibodies diluted in PBS/M.O.M., and then anti-mouse-anti-rabbit biotin (1:200; Vector Laboratories) or anti-mouse-anti-rabbit-Alexa 488-Alexa 594 (1:400; Molecular Probes) secondary antibodies were applied in PBS/M.O.M. blocking solution for 30 minutes at room temperature. If necessary, the sections were incubated for 10 minutes with streptavidin-Alexa 488-594 conjugates (1:400; Molecular Probes). For peanut agglutinin (PNA) detection in the testes, after incubation with the secondary antibodies, the sections were exposed to a fluorescein isothiocyanate-conjugated lectin peanut agglutinin from *Arachis hypogea* for 10 minutes (FITC-PNA, 1:1000; Sigma). In some cases, sections were stained with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI; Molecular Probes). Stained sections were mounted in Mowiol (Molecular Probes) and viewed with a Nikon fluorescence microscope or a Leica confocal microscope.

Results

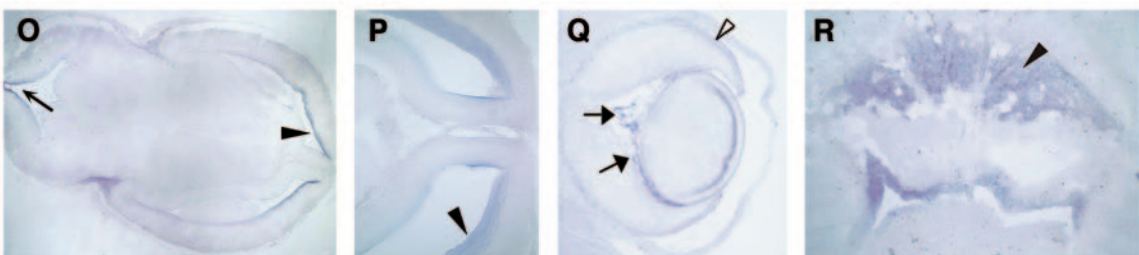
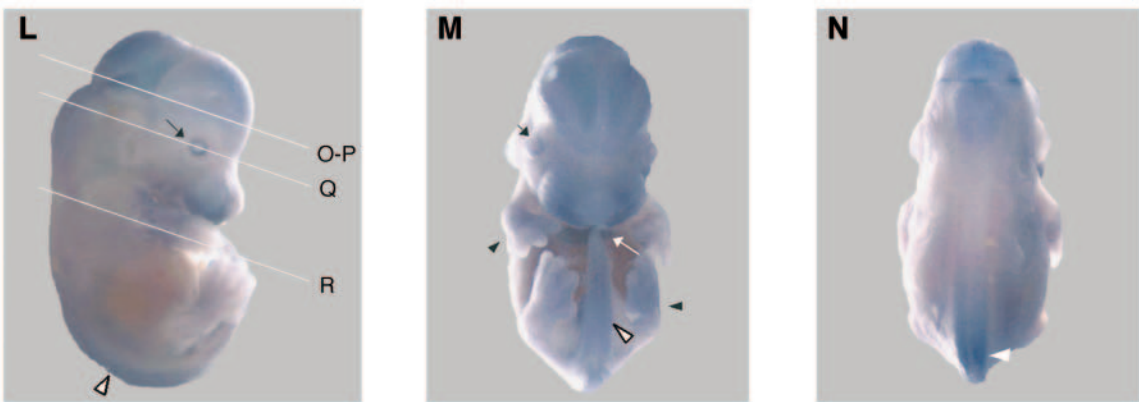
mPomt1 RNA Is Expressed in Critical Regions of the Developing Mouse Brain and Cerebellum

We previously reported that the *mPomt1* gene is expressed during early mouse embryogenesis (E8.5 to E10.5) in the developing nervous system, the muscles, and the eye.²¹ To determine whether *Pomt1* expression pattern was maintained in later developmental stages, we performed whole-mount *in situ* hybridization on E12.5 and E13.5 mouse embryos. At these developmental stages, weak expression of *Pomt1* mRNA was relatively ubiquitous, whereas stronger expression was observed in specific tissues. At E12.5, *Pomt1* RNA was detected in the developing eye, the limb buds, and along the spinal cord (Figure 1, A and B). However, the strongest expression of *Pomt1* was concentrated in the cephalic region where the brain and cerebellum develop (Figure 1, A-C). At E13.5, *Pomt1* expression was weaker but maintained in the developing eye, limb buds, and spinal cord, but it was no longer so prominent in the cephalic region (Figure 1, L-N). In contrast, transcripts could now also be seen in

E12.5



E13.5



the heart (Figure 1M). In different cross sections of the rostral part of hindbrain at E12.5, *Pomt1* RNA was detected in the ependymal layer of the metencephalon (Figure 1, G–I), the mantle layer of myelencephalon (Figure 1, G and H), and the roof of the fourth ventricle, where the strongest expression was observed (Figure 1, E–I). In the forebrain, *Pomt1* transcripts were detected in the ependymal layer of the third and lateral ventricles, although the strongest expression was detected in the mantle layer of telencephalic vesicles (Figure 1, F–I). In the mantle layer, *Pomt1* RNA was detected in proliferating neuroblasts that later migrate through the outer marginal layer of the telencephalic vesicles. Furthermore, *Pomt1* transcripts appeared to be present in some migrating neuroblasts (Figure 1, J and K).

In cross sections at the cephalic level of an E13.5 embryo, *Pomt1* expression was still evident in the roof of the fourth ventricle (Figure 1O) as well as in the mantle layer of telencephalic vesicles (Figure 1, O and P). In the developing eye, basal levels of *Pomt1* transcripts were detected in the pigmented retinal layer. However, the strongest expression was localized to the hyaloid cavity, mainly in the vascular vessels associated with the lens and the neural retinal layer (Figure 1Q). The expression of *Pomt1* RNA in the developing eye was corroborated by immunofluorescence studies on E13.5 cryosections using the affinity-purified polyclonal antiserum generated against hPOMT1 protein (anti-POMT1). This antiserum also recognizes mPomt1 protein, because the amino acid sequence in loop 5 that it recognizes is highly conserved (80% identity). The mPomt1 protein was localized in a very similar pattern to its RNA (Supplemental Figure 1, B and C, see <http://ajp.amjpathol.org>). When *Pomt1* RNA expression was analyzed in the rest of the body, the strongest expression was detected in the ventricular walls of the heart (Figure 1R). These findings suggest that POMT1 could play an important role in the development of the brain, the cerebellum, and the eye and that it might be responsible for the severe brain and eye anomalies presented by patients with WWS.

Distribution of Dystroglycan and *Pomt1* Protein in Adult Mouse Muscle

The best known O-mannosylated glycoprotein that serves as a substrate for POMT1 and POMT2 is α -DG.⁴ This glycoprotein is present in several tissues, and although its amino acid sequence predicts a protein of \approx 70 kd, its molecular mass varies depending on the degree of

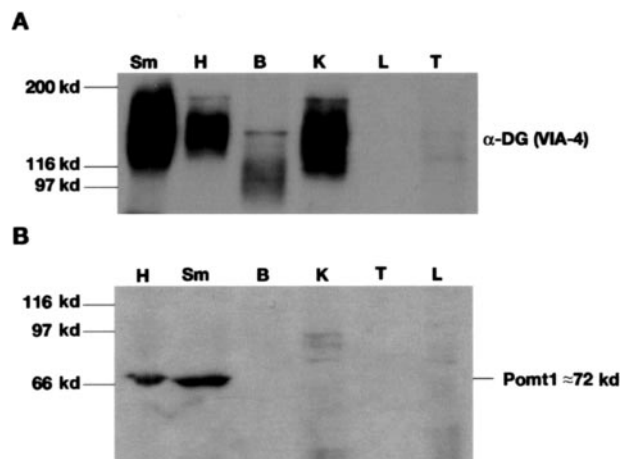


Figure 2. Western blot of protein extracts from mouse adult tissues. Total protein extracts (30 μ g) were probed with VIA-4 antibodies that recognize glyco-epitopes of α -DG. The distinct molecular mass in each tissue is determined by the pattern of glycosylation (A). Microsomal protein extracts (50 μ g) probed with anti-POMT1 antibodies. The 72-kd band detected in the heart and skeletal muscle corresponds to the mPomt1 protein (B). Sm, skeletal muscle; H, heart; B, brain; K, kidney; L, liver; T, testis.

glycosylation in each tissue: 120 kd in the brain and peripheral nerves, 140 kd in heart, and 156 kd in skeletal muscle.^{24,25} Western blot analysis of some adult mouse tissues using a monoclonal antibody that specifically recognizes glyco-epitopes of α -DG (VIA-4) showed that α -DG is glycosylated to a variable degree in heart, skeletal muscle, brain, and kidney. However, it is notable that it does not seem to be glycosylated in the liver and that it is weakly glycosylated in the testes (Figure 2A). We attempted to determine whether mPomt1 protein expression correlated with that of glycosylated α -DG. In Western blot analysis, the affinity-purified anti-POMT1 antiserum was only able to detect a \approx 72-kd band that corresponded to the mPomt1 protein in heart and skeletal muscle (Figure 2B). Accordingly, the α -DG in these tissues must be O-mannosylated.

To examine further the distribution of *Pomt1* in mouse muscle tissue and its relationship to DG, we performed indirect immunofluorescence on cryosections of skeletal and cardiac muscle with the anti-POMT1 antiserum and anti-DG antibodies (anti- α -DG and anti- β -DG). In skeletal muscle fibers, whereas mPomt1 was localized to the sarcoplasmic reticulum, as well as to the peripheral region of cells under the sarcolemma (Figure 3A), both DG subunits were relegated to the sarcolemmic region (Figure 3, B and E).²⁵ In heart cryosections, *Pomt1* was detected in the sarcoplasmic reticulum of cardiac cells

Figure 1. Whole-mount expression of *Pomt1* in mouse embryos. Whole-mount *in situ* hybridization (A, B, C, L, M, and N) and representative cryosections of E12.5 embryos taken at the level of cephalic region indicated by the white line in A (E, F, G, H, and I, magnification \times 4) and of E13.5 embryos taken at the level indicated by a white line in L (O–R; P–R, magnification \times 10). Magnification of the telencephalic vesicles in G (J, magnification \times 40; K, magnification \times 60). At E12.5, the maximal *Pomt1* expression was detected in the head (A–C), whereas lower levels of expression were seen in the limb buds and the spinal cord (A and B, black and white arrowheads, respectively). In the hindbrain, *Pomt1* was detected in the mantle layer of myelencephalon (G and H, white arrowheads), as well as in the ependymal layer of metencephalon (G–I, black arrowheads). However, the strongest expression was detected in the roof of the fourth ventricle (E–I, white arrows). In the forebrain, *Pomt1* was expressed in the ependymal layer of the third ventricle (F and G, open black arrowhead). The maximal expression was seen in the mantle layer of telencephalic vesicles (F–I, black arrows) where *Pomt1* RNA was detected in mitotic neuroblasts (J and K, white arrowheads), as well as in neuroblasts migrating to the marginal layer (J and K, black arrows). At E13.5, *Pomt1* expression was maintained in the developing eye (L and M, black arrows), the limb buds (M, black arrowheads), the spinal cord (L–N, white arrowheads), and the heart (M, white arrow). *Pomt1* expression was also maintained in the roof of the fourth ventricle (O, open arrow) and in the mantle layer of the telencephalic vesicles (O and P, arrowheads). *Pomt1* RNA was detected in the pigmented retinal layer of the developing eye (Q, white arrowhead) and in the hyaloid cavity (Q, black arrows). *Pomt1* transcripts were also seen in the walls of the heart (R, arrowhead).

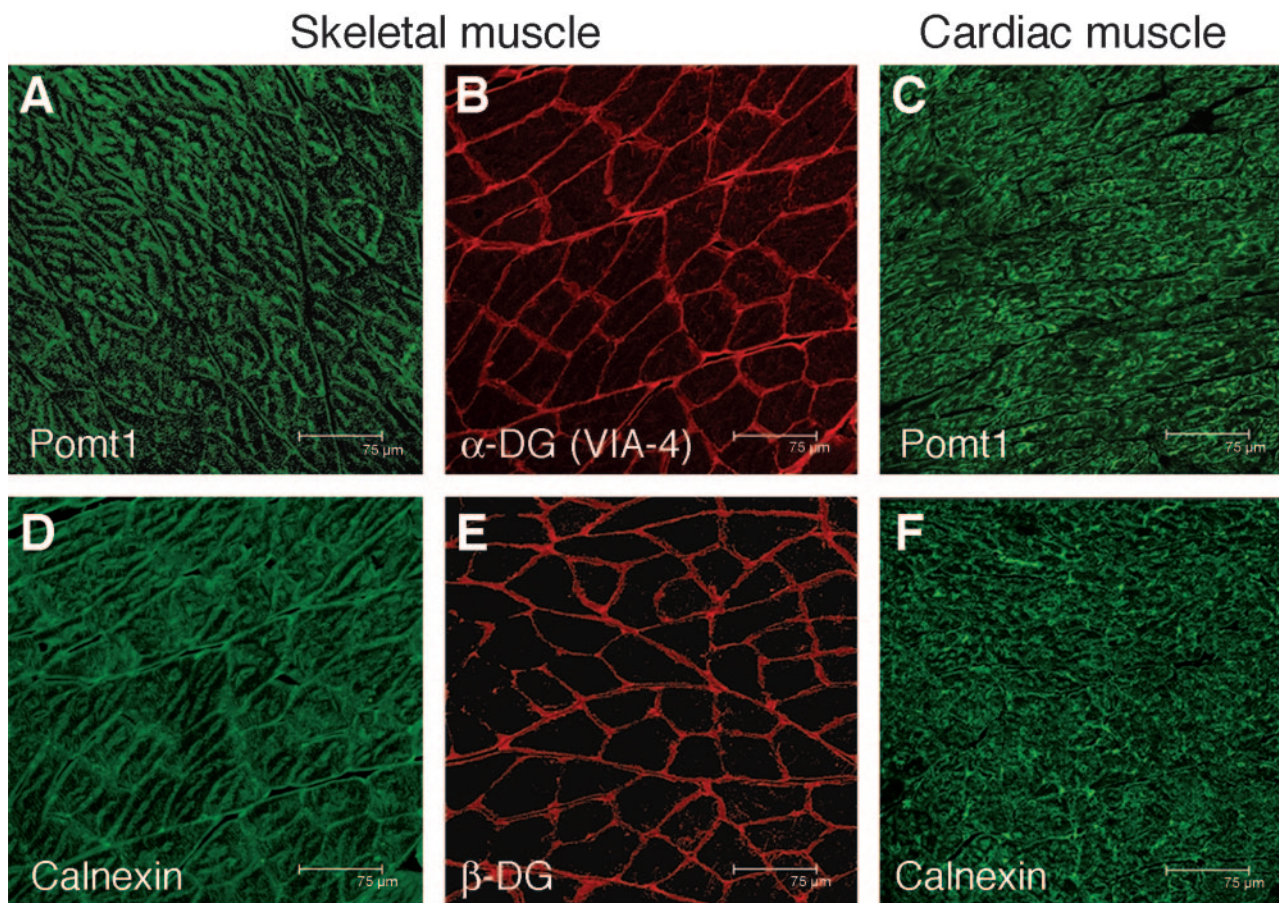


Figure 3. Pomt1 and DG immunodetection on muscle tissues. Immunodetection of mPomt1, DG, and the ER marker calnexin in skeletal and cardiac muscle sections. Incubation with anti-POMT1 (A and C), anti- α -DG, VIA-4 (B), anti- β -DG (E), and anti-calnexin (D and F). Pomt1 was localized in the sarcoplasmic reticulum of skeletal and cardiac cells (A and C), as well as in the subsarcolemmic region of skeletal muscle cells (A) displaying a very similar distribution to the ER marker calnexin in both skeletal (C) and cardiac (F) muscle cells. The glyco-epitopes of α -DG and β -DG subunits were localized in the sarcolemma (B and E). Fluorescence microscopy images, magnification $\times 40$.

(Figure 3C), displaying a similar pattern of expression to the ER marker calnexin in both skeletal and cardiac muscle (Figure 3, D and F).

POMT1 and POMT2 seem to act together to produce maximal enzymatic activity.⁴ Since the RNA expression pattern of both POMT1 and POMT2 is very similar in adult mouse tissues,²¹ it seems likely that both proteins will be present in the same tissues. Immunofluorescent staining of muscle tissue with anti-POMT2 antibodies corroborated this hypothesis, since this protein appeared to be localized to the same compartment as mPomt1 in skeletal and cardiac muscle (Supplemental Figure 2, A and B, see <http://ajp.amjpathol.org>).

mPomt1 RNA Is Expressed in the Diploid Phase of Spermatogenesis, and the Protein Is Mainly Localized to the Acrosome of Maturing Spermatids

We had previously observed the strongest expression of Pomt1 mRNA in mouse testes,²¹ and here we have further examined the expression of the *mPomt1* gene within the testes by performing *in situ* hybridization on sections

of this tissue. Pomt1 mRNA was mainly detected in the diploid phase of spermatogenesis, in spermatogonia, and primary spermatocytes. No significant expression of Pomt1 mRNA was detected in postmeiotic cells such as the secondary spermatocytes, maturing spermatids, or sperm (Figure 4, A and B).

Immunofluorescence studies with the anti-Pomt1 antiserum on sections from the testes were performed to verify whether the localization of the mPomt1 protein correlated with that of mPomt1 RNA. The Pomt1 protein was clearly detected in the acrosome of spermatids in all stages of maturation, either in the round spermatids in the cap phase (Figure 4C) or as elongated spermatids in the acrosome and maturation phase (Figure 4, D and E). Because the acrosome is a sperm-specific organelle and POMT1 is an integral membrane protein of the ER (data not shown),⁵ we wanted to confirm this localization by co-immunofluorescence of Pomt1 and the acrosomic marker lectin PNA. A perfect correlation was detected in the distribution of both proteins in the acrosome of round (Figure 5C) and elongated spermatids (Supplemental Figure 3, C and D, see <http://ajp.amjpathol.org>). However, a weak Pomt1 signal was also detected in the spermatogonia and primary spermatocytes (Figure 5, B and C),

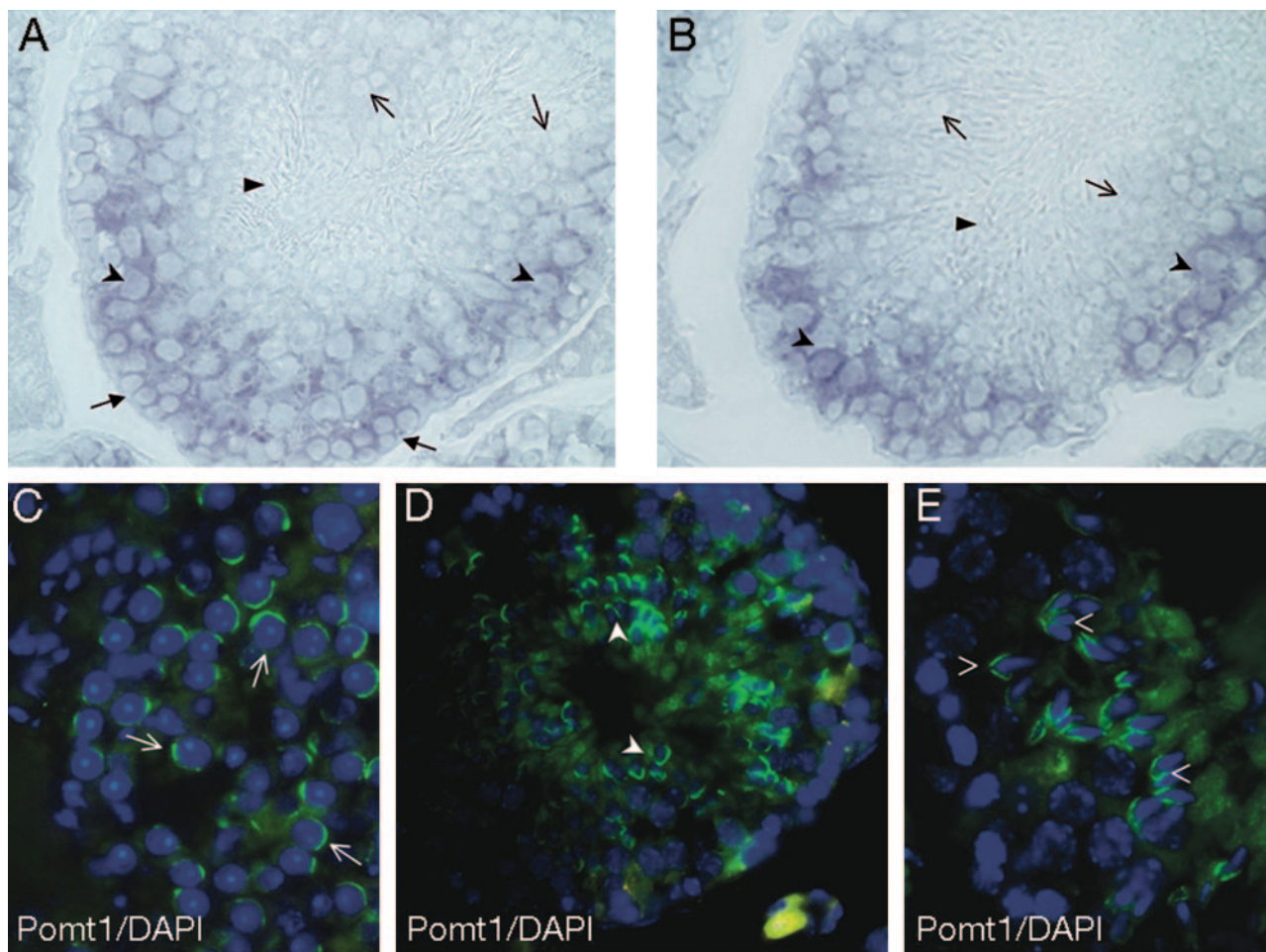


Figure 4. Pomt1 RNA and protein expression in mouse testes. *In situ* hybridization on testes sections showing the expression of Pomt1 RNA in spermatogonial cells next to the wall of seminiferous tubules (black arrows) and in primary spermatocytes (A and B, open black arrowheads). No mRNA was apparent in spermatids (open black arrows) or mature sperm (black arrowheads). Fluorescence microscope images of Pomt1 immunodetection in testis sections (C and E, magnification $\times 100$; D, $\times 60$) where Pomt1 (green) was localized in the acrosome of spermatids at all stages of maturation: cap phase round spermatids (C), elongating spermatids in the acrosome phase (D) and elongated maturing spermatids. 4,6-Diamidino-2-phenylindole stained the nuclei (blue).

although Pomt1 was confined to the ER in these cells because it displayed a very similar distribution to the ER marker calnexin (Figure 5D). Very similar RNA and protein expression patterns have been reported for Pomt2.³

We examined whether mouse Pomt1 might play a role in male fertility by programming crosses between female wt mice and male heterozygous *Pomt1*^{+/-} mice.²¹ However, the progeny of these crosses were wt and heterozygous in a $\approx 1:1$ ratio as would be expected by Mendelian inheritance (data not shown). These data suggest that Pomt1 may play a role in spermatogenesis, although it seems not to be essential for male fertility in the mouse.

A Novel O-Mannosylation Substrate for Pomt1 and Pomt2 Might Exist in the Testes

Because α -DG is the main O-mannosylation substrate for both POMT1 and POMT2, we determined whether DG proteins were found in the same cell types as POMTs. Previous studies showed that both the α - and β -DG subunits were present almost exclusively in the basement membrane of the seminiferous tubules,²⁵ even though

the antibodies used in these studies detected both the α - and β -subunits of dystroglycan protein and not the glycosidic residues of α -DG. Indirect immunofluorescence with anti- β -DG antibodies corroborated that the β -DG subunit was present in the basement membrane (Figure 6A). Our Western blot data indicated that α -DG was only weakly glycosylated in the testes (Figure 2A). Indeed, immunofluorescence studies with anti- α -DG (VIA-4) antibodies suggested that α -DG was only glycosylated in the basement membrane of the seminiferous tubules (Figure 6B). No glycosylated α - or β -DG subunits were found in the maturing spermatids where Pomt1/Pomt2 were located, suggesting that both Pomt proteins might have a different O-mannosylation substrate in these cells.

Discussion

Defects in the O-glycosylation of α -DG have been associated with a group of neuromuscular diseases that are caused by mutations in genes that encode glycosyltransferases or putative glycosyltransferases.^{1,6-8} WWS is the

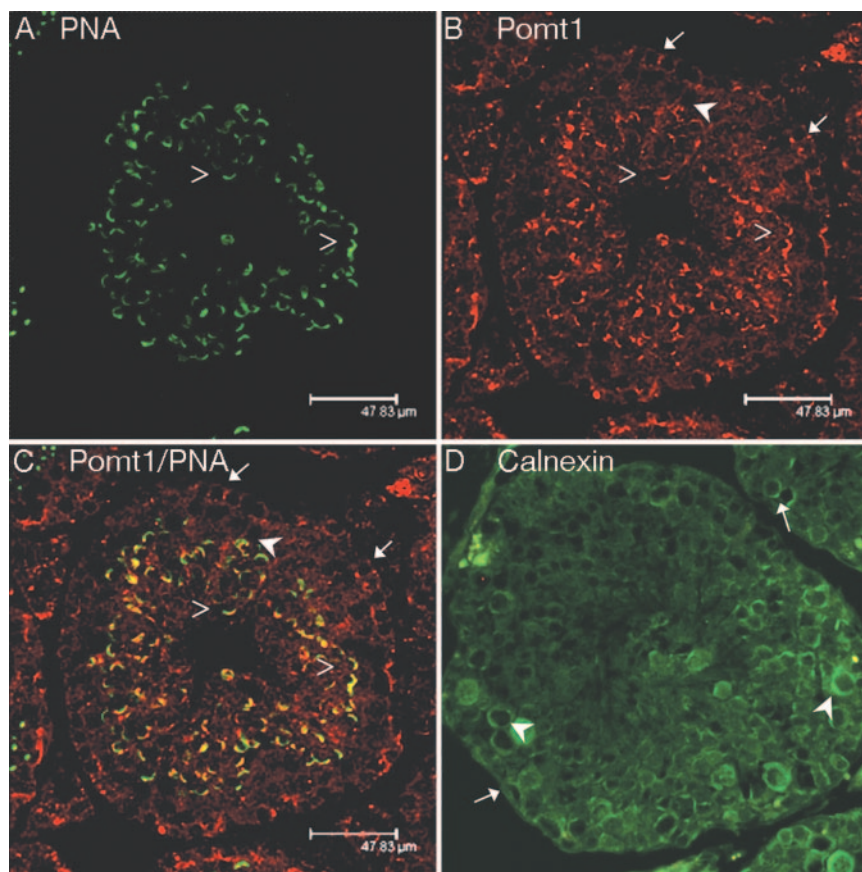


Figure 5. Co-localization of Pomt1 and the acrosomal marker PNA in seminiferous tubules. Localization of the PNA acrosomal marker (A) and Pomt1 (B, open arrowheads) to the acrosome of round spermatids in confocal microscopy images, magnification $\times 40$. Co-localization of peanut agglutinin and Pomt1 (C). Pomt1 was expressed more weakly in spermatogonia (B and C, white arrows) and primary spermatocytes (B and C, white arrowheads), even though in these cells Pomt1 co-localized with the ER marker calnexin (D).

most severe of these disorders, a recessive CMD that combines ocular abnormalities and multiple brain malformations, including type II lissencephaly. WWS is mainly caused by mutations in the *hPOMT1* gene. Moreover, *hPOMT1* mutations have also been found in milder forms of muscular dystrophies like CMD/MR and LGMD2K.^{15,19}

Given that mutations in the *hPOMT1* gene are responsible for a group of neuromuscular disorders with different degrees of severity, it is of interest to establish a

relationship between *POMT1* expression and the clinical aspects observed in these diseases. We have previously shown that *Pomt1* RNA is expressed during mouse embryonic development and suggested that *Pomt1* is important for the development of the nervous system, the muscles, and the eye, which are the tissues most severely affected in patients with WWS.²¹ In this study, we confirmed that this pattern of RNA expression is maintained in later developmental stages (E12.5 and E13.5). In the hindbrain at E12.5, we show that *mPomt1* transcripts are found in the ependymal and mantle layer of the metencephalon and myelencephalon, respectively, regions that will become the cerebellum and medulla oblongata. Furthermore, we found maximal *mPomt1* expression in the roof of the fourth ventricle, where the choroid plexus produces the cerebrospinal fluid in this region of the brain. The cerebrospinal fluid flows through the ventricular system to the central canal of the spinal cord, passing through the foramina of Luschka and Magendie situated in the roof of the fourth ventricle.²⁶ When these pores are obstructed, the ventricles fill with cerebrospinal fluid and hydrocephalus is produced.^{27,28}

In the forebrain, the main *mPomt1* expression was detected in the mantle layer of lateral ventricles or telencephalic vesicles, especially in the neuroblasts of the mantle layer. At E12.5 to E13, the postmitotic neurons

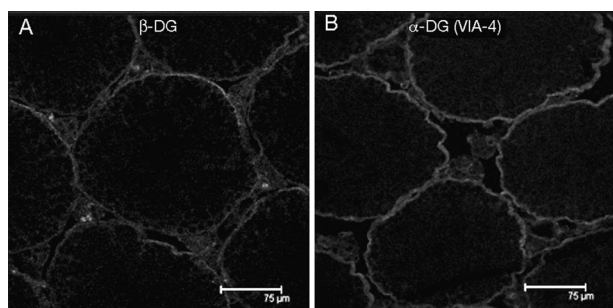


Figure 6. Immunodetection of α - and β -DG in mouse testes. The β -DG subunit was found in the basal membrane region of the walls of the seminiferous tubules (A). The α -DG subunit was also found in the basal membrane region, and it was *O*-glycosylated, because the VIA-4 antibodies recognize the α -DG glycoepitopes (B). No signal of α - or β -subunits was detected in any type of germ cell. Confocal microscopy images, magnification, $\times 40$.

start to migrate to the marginal layer constituting the neopallial cortex that becomes the cerebral cortex.²⁶ We have detected *Pomt1* transcripts in what seem to be neuroblasts migrating to the marginal layer.

Together, these data suggest that *Pomt1* expression in the hindbrain and forebrain could be related to the brain anomalies found in patients with WWS.^{11–13} Furthermore, the *Pomt1* expression in the metencephalon and myelencephalon could be related to cerebellar hypoplasia, absence of the septum and cerebellar vermis, and other cerebellar defects; the expression of *Pomt1* in the fourth ventricle could be related to both the hydrocephalus and the dilation of the fourth ventricle. And finally, the presence of *Pomt1* in the telencephalic vesicles is particularly relevant if we consider that neuronal migration defects in humans produce severe anomalies in the cerebral cortex such as cobblestone cortex or type II lissencephaly.²⁹

The eye abnormalities found in patients with WWS involve cataracts, retinal detachment or dysplasia, and persistent hyperplastic primary vitreous, among others.^{11,13} We have shown that in the developing eye, both the *Pomt1* RNA and protein were expressed in the pigmented retinal layer as well as in the hyaloid vessels of hyaloid cavity. These vessels form a vascular network on the posterior surface of the lens, supply the neural retina with blood, and are responsible for the formation of the vitreous humor.³⁰ These data suggest that POMT1 is implied in the development of the eye and that it could be related to some of the ocular abnormalities detected in patients with WWS.

In the adult mouse tissues analyzed, we mainly detected the *Pomt1* protein in skeletal and cardiac muscle tissue. We did not find *Pomt1* in the adult brain, which suggests that POMT1 mainly acts during brain development. This fact may imply that the *O*-mannosyl glycans are most important when the brain structures that require them are forming.

In muscle tissues, we found that α -DG is *O*-glycosylated. As expected, given that POMT1 is an integral ER protein, we specifically detected m*Pomt1* in the sarcoplasmic reticulum of skeletal and cardiac fibers. The m*Pomt1* protein was also localized to the sarcolemma of skeletal muscle cells, as were the glycosylated α -DG and the β -DG subunit. Nevertheless, the *Pomt1* detection in this region corresponds to the sarcoplasmic reticulum located just under the sarcolemma. We also found that *Pomt2* protein localizes to the sarcoplasmic reticulum in skeletal and cardiac muscle cells.

These findings are consistent with the muscle phenotype found in the diseases caused by *POMT1* and/or *POMT2* mutations: WWS, CMD/MR, and LGMD2K.^{15,16,19,20} Furthermore, the detection of m*Pomt1* in adult muscle suggests that POMT1 not only fulfills a role in the development of these tissues but that it also plays an important role, together with POMT2, in helping to maintain these structures in the adult, probably by *O*-mannosylating α -DG when muscle fiber regeneration requires it.

We previously reported that *Pomt1* mRNA expression was maximal in adult testes.²¹ Spermatogenesis takes place in the seminiferous tubules and involves mitotic

proliferation of spermatogonia, meiosis, and spermiogenesis, in which the haploid spermatids differentiate into sperm.³¹ Here, we show that *Pomt1* RNA was present in spermatogonia and primary spermatocytes, whereas the protein was mainly localized to the acrosome of haploid spermatids at all stages of maturation, although some *Pomt1* was detected in the ER of diploid cells. Similar RNA and protein expression were described for m*Pomt2* in testes,³ suggesting that both POMTs might fulfill a similar role in this tissue and could be involved in murine spermatogenesis. The acrosome is a specific organelle of maturing spermatids and sperm that plays an important role during fertilization.³² Here, we have shown that *Pomt1*-null sperm are able to fertilize wt eggs, because the offspring of male *Pomt1*^{+/-} mice with wt females produced 50% wt and heterozygous animals. Together, these findings suggest that, whereas *Pomt1* might be involved in fertilization, it is not essential for this process in the mouse. Further analyses will be needed to define what function POMT1 fulfills in fertilization.

With regard to the main *O*-mannosylation substrate for POMTs, α -DG seems to be relegated to the basement membrane of seminiferous tubules together with the β -subunit, being the only site where it is *O*-glycosylated. If mouse *Pomt1* act as *O*-mannosyltransferases in maturing spermatids and sperm, a novel *O*-mannosylation substrate might exist because α -DG is not present in these cells.

It is important to note that apart from the typical involvement of the brain and eye, some male patients with WWS display genital anomalies, and it has been suggested that the gene(s) responsible directly affect testicular development.^{11,22} The results reported here may establish a closer relationship between POMT1 and the muscular, brain, ocular, and genital abnormalities that characterize the WWS. Tissue-specific deletion of *Pomt1* in those tissues or organs affected in neuromuscular diseases caused by *POMT1* mutations will help us to elucidate the pathomechanism by which *O*-mannosyltransferases cause such severe phenotypes.

Acknowledgments

We thank Raúl Borrego and Saleta Dolores for excellent technical assistance, and we are grateful to Dr. Sabine Strahl for generously providing us with the POMT2 antibody. We thank M. Sefton for critical reading of the manuscript.

References

1. 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, 13:621–630
2. Jurado LA, Coloma A, Cruces J: Identification of a human homolog of the *Drosophila* rotated abdomen gene (*POMT1*) encoding a putative protein O-mannosyl-transferase, and assignment to human chromosome 9q34.1. *Genomics* 1999, 58:171–180
3. Willer T, Amselgruber W, Deutzmann R, Strahl S: Characterization of POMT2, a novel member of the MANNOSYLTRANSFERASE protein

- O-mannosyltransferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids. *Glycobiology* 2002, 12:771–783
4. 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
 5. Akasaka-Manya K, Manya H, Nakajima A, Kawakita M, Endo T: Physical and functional association of human protein O-mannosyltransferases 1 and 2. *J Biol Chem* 2006, 281:19339–19345
 6. Cohn RD: Dystroglycan: important player in skeletal muscle and beyond. *Neuromusc Disord* 2005, 15:207–217
 7. Jimenez-Mallebrera C, Brown SC, Sewry CA, Muntoni F: Congenital muscular dystrophy: molecular and cellular aspects. *Cell Mol Life Sci* 2005, 62:809–823
 8. Endo T: Structure, function and pathology of O-mannosyl glycans. *Glycoconj J* 2004, 21:3–7
 9. Muntoni F, Voit T: The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress. *Neuromusc Disord* 2004, 14:635–649
 10. Muntoni F, Brockington M, Torelli S, Brown SC: Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* 2004, 17:205–209
 11. Dobyns WB, Pagon RA, Armstrong D, Curry CJ, Greenberg F, Grix A, Holmes LB, Laxova R, Michels VV, Robinow M, Zimmerman RL, Opitz JM, Reynolds JF: Diagnostic criteria for Walker-Warburg syndrome. *Am J Med Genet* 1989, 32:195–210
 12. van Reeuwijk J, Brunner HG, van Bokhoven H: Glyc-O-genetics of Walker-Warburg syndrome. *Clin Genet* 2005, 67:281–289
 13. Vajsar J, Schachter H: Walker-Warburg syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2006, 1:29
 14. Beltrán-Valero de Bernabe D, Currier S, Steinbrecher A, Celli J, van Beusekom E, van der Zwaag B, Kayserili H, Merlini L, Chitayat D, Dobyns WB, Cormand B, Lehesjoki AE, Cruces J, Voit T, Walsh CA, van Bokhoven H, Brunner HG: Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet* 2002, 71:1033–1043
 15. 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
 16. van Reeuwijk J, Janssen M, van den Elzen C, Beltrán-Valero de Bernabe D, Sabatelli P, Merlini L, Boon M, Scheffer H, Brockington M, Muntoni F, Huynen M, Verrips A, Walsh C, Barth P, Brunner H, van Bokhoven H: POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker Warburg syndrome. *J Med Genet* 2005, 42:907–912
 17. Beltrán-Valero de Bernabe D, Voit T, Longman C, Steinbrecher A, Straub V, Yuva Y, Herrmann R, Sperner J, Korenke C, Diesen C, Dobyns WB, Brunner HG, van Bokhoven H, Brockington M, Muntoni F: Mutations in the FKRP gene can cause muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet* 2004, 41:e61
 18. 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
 19. 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. *Neuromusc Disord* 2005, 15:271–275
 20. Mercuri E, D'Amico A, Tessa A, Berardinelli A, Pane M, Messina S, van Reeuwijk J, Bertini E, Muntoni F, Santorelli FM: POMT2 mutation in a patient with "MEB-like" phenotype. *Neuromusc Disord* 2006, 16:446–448
 21. Willer T, Prados B, Falcon-Perez JM, Renner-Muller I, Przemek 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
 22. Hung NA, Silver MM, Chitayat D, Provias J, Toi A, Jay V, Becker LE: Gonadoblastoid testicular dysplasia in Walker-Warburg syndrome. *Pediatr Dev Pathol* 1998, 1:393–404
 23. Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R: Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003, pp 677–684
 24. Martin PT: Dystroglycan glycosylation and its role in matrix binding in skeletal muscle. *Glycobiology* 2003, 13:55R–66R
 25. Durbeej M, Henry MD, Ferletta M, Campbell KP, Ekblom P: Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues. *J Histochem Cytochem* 1998, 46:449–457
 26. Kaufman MH, Bard JBL: The Anatomical Basis of Mouse Development. San Diego, Academic Press, 1999, pp 171–193
 27. Hirsch JF, Pierre-Kahn A, Renier D, Sainte-Rose C, Hoppe-Hirsch E: The Dandy-Walker malformation: a review of 40 cases. *J Neurosurg* 1984, 61:515–522
 28. Carpentier A, Brunelle F, Philippon J, Clemenceau S: Obstruction of Magendie's and Luschka's foramina: cine-MRI, aetiology and pathogenesis. *Acta Neurochir (Wien)* 2001, 143:517–512
 29. Kato M, Dobyns WB: Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration. *Hum Mol Genet* 2003, 12(Spec 1):R89–R96
 30. Kaufman MH: The Atlas of Mouse Development. San Diego, Academic Press, 1995
 31. Hecht NB: Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays* 1998, 20:555–561
 32. Abou-Haila A, Tulsiani DR: Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys* 2000, 379:173–182